

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

**Primocolonización por “Pseudomonas aeruginosa” en la colonización
patogénica broncopulmonar en fibrosis quística: diagnóstico por técnicas de
microbiología molecular, estudio de clonalidad y crecimiento en biofilm**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ana Fernández Olmos

Directores

Rafael Cantón Moreno

Rosa del Campo Moreno

Madrid, 2016



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología II

**Primocolonización por “Pseudomonas aeruginosa” en la
colonización patogénica broncopulmonar en fibrosis quística:
diagnóstico por técnicas de microbiología molecular, estudio de
clonalidad y crecimiento en biofilm**

Tesis doctoral presentada por

Ana Fernández Olmos

Para la obtención del grado de Doctor

Los directores del trabajo

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Rosa del Campo Moreno

Servicio de Microbiología



Memoria presentada en la Facultad de Farmacia
de la Universidad Complutense de Madrid
por Dña. Ana Fernández Olmos
para la obtención del grado de doctor

Directores

Dr. Rafael Cantón Moreno.

Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Profesor Asociado. Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense. Madrid.

Dra. Rosa del Campo Moreno.

Servicio de Microbiología. Hospital

Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS).

Rafael Cantón Moreno, Jefe de Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, y

Rosa del Campo Moreno, Investigador Estabilizado en el IRYCIS en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid,

Por la presente certifican que la memoria titulada **“Primocolonización por “Pseudomonas aeruginosa” en la colonización patogénica broncopulmonar en fibrosis quística: diagnóstico por técnicas de microbiología molecular, estudio de clonalidad y crecimiento en biofilm”**, ha sido realizada bajo nuestra dirección por la doctoranda Ana Fernández Olmos en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal, y estimando que se encuentra finalizada y en condiciones de optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, se solicita sea admitida a trámite para su lectura y defensa pública.

Madrid, a 10 de Junio de 2015

Dr. Rafael Cantón Moreno

Dra. Rosa del Campo Moreno

A Luismi y Sandra

A todos los que habéis colaborado

Agradecimientos

Esta tesis se ha ido dando forma poco a poco, y una vez que se han ensamblado todos sus abalorios (piezas) ha resultado un conjunto armonioso...

Una vez finalizada esta etapa de mi vida, me gustaría dar las gracias a todas las personas que lo han hecho posible, aunque hacerlo con palabras deja atrás muchos sentimientos que no pueden expresarse...

Agradecer al Dr. Rafael Cantón, director de esta Tesis, primero la oportunidad de incorporarme al ámbito de la investigación y después toda la confianza que ha depositado en mí durante todos estos años, y toda la ayuda que me ha ofrecido siempre, no sólo en la elaboración de la Tesis, sino en hacer posible el formar parte de su equipo.

Agradecer a la Dra. Rosa del Campo, directora de esta Tesis, por la ayuda y el tiempo que me ha dedicado y por las palabras de ánimo que he recibido en todo momento.

También quisiera agradecer al Dr. Fernando Baquero por contagiarme sus ganas de aprender desde el primer día que le conocí.

A todos mis compañeros del Servicio de Microbiología, porque ellos entienden toda la emoción que esto comporta. En la primera etapa como Residente, a todos los que me enseñaron a apreciar el mundo de las bacterias. En la segunda etapa, todos habéis colaborado de una forma u otra para hacer realidad esto que está ahora en vuestras manos, lo sabéis, gracias compañeros de la “parte de investigación”.

Gracias a todos los compañeros de residencia por compartir mis penas y alegrías. En especial, quisiera agradecer a Patricia, Marta y Elia, no sólo la ayuda que me han brindado para la Tesis, sino el apoyo moral me han ofrecido en estos últimos años, gracias por ser mis compañeras y amigas. También a Ana Moreno (a.m.bofarull) mi agradecimiento por todo lo que hemos compartido, que ha sido mucho en tan pocos metros cuadrados.

Un agradecimiento especial para todos aquellos que me habéis acompañado en el apasionante mundo de la fibrosis quística, tanto en el laboratorio como en la parte clínica.

A todos aquellos con los que he tenido la suerte de colaborar y que habéis contribuido en mi formación de una forma muy agradable tanto dentro como fuera de la Universidad Complutense.

Gracias a todos mis amigos por acompañarme en este proceso, tanto en los momentos alegres como en los más tristes o de más agobios, sin importar en dónde estuviera.

Y sin duda el agradecimiento mayor debe ir a mi familia. A mis padres porque siempre habéis confiado en mis posibilidades. A mi hermano David, aún en la distancia te siento cerca. A mis suegras, María José y Raúl porque siempre habéis estado dispuestos a escucharme y ayudarme. A Luismi, ¿qué puedo decirte que no sepas ya? Gracias por estar ahí en los buenos y malos momentos, por compartir tantos años de mi vida (y los que nos quedan), por ser el pilar que me sostiene, por hacer posible que yo siguiera el camino que en su día elegí, por tu optimismo inagotable, por tus conocimientos tan útiles en la vida (informáticos y de toda índole).... También aprovecho para enviar besitos a mi pequeña Sandra, que la quiero con locura y que fue el empujón definitivo para concluir esta tesis.

Debo agradecer, también, al Ministerio de Sanidad por la concesión de una beca pre-doctoral y un contrato Río Hortega, que me ha permitido terminar la Tesis.



ÍNDICE

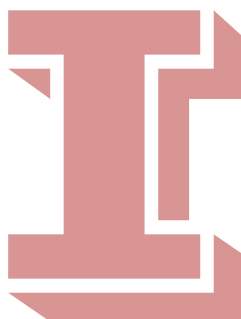
INTRODUCCIÓN	3
1. Fibrosis quística	3
1.1. Antecedentes históricos	3
1.2. Fisiopatogenia	3
1.3. Alteraciones en la proteína CFTR	5
1.4. Respuesta inflamatoria	7
1.5. Manifestaciones clínicas	10
1.6. Diagnóstico de FQ	11
1.7. Cribado neonatal	13
2. Colonización e infección en el paciente con fibrosis quística	14
2.1. Colonización patogénica	14
2.2. Cronología en la aparición de los microorganismos	15
3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21
3.1. Características microbiológicas	21
3.2. Epidemiología e importancia clínica	22
3.3. Primocolonización	23
3.4. Evolución de la colonización-infección por <i>P. aeruginosa</i>	25
3.5. Resistencia antimicrobiana e hipermutación	28
4. Estrategias de prevención de colonización por <i>P. aeruginosa</i>	30
4.1. Vacuna frente <i>P. aeruginosa</i>	30
4.2. Profilaxis antibiótica.	31
4.3. Inhalación de suero salino hipertónico.	31

4.4.	Cribado neonatal.....	32
4.5.	Detección precoz de <i>P. aeruginosa</i>	32
4.5.1.	Detección por técnicas de PCR.....	32
4.5.2.	Detección de anticuerpos frente <i>P. aeruginosa</i>	35
4.6.	Evaluación microbiológica en el paciente con fibrosis quística. .	35
5.	Tratamiento de <i>P. aeruginosa</i>	37
5.1.	Tratamiento en la fase de primocolonización.....	37
5.2.	Tratamiento en la fase de colonización crónica.....	39
5.3.	Tratamiento modulador	39
5.4.	Nuevas estrategias para racionalizar la terapia antimicrobiana .	40
6.	Epidemiología molecular de <i>P. aeruginosa</i>	41
6.1.	Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)	41
6.2.	MultiLocus Sequence Typing (MLST).....	41
6.3.	Rep-PCR.....	42
6.4.	Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	43
7.	Crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> en biopelículas	44
7.1.	Definición de biopelículas o biofilms.....	44
7.2.	Biopelículas y colonización/infección.....	45
7.3.	Etapas en el proceso de formación del biopelículas	46
7.4.	Resistencia de biopelículas a los antimicrobianos	48
7.5.	Estudio de sensibilidad de <i>P. aeruginosa</i> . Crecimiento en biopelículas.....	51
	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55

MATERIAL Y MÉTODOS	61
1. Colonización broncopulmonar en pacientes de la Unidad de FQ63	
2. Selección de pacientes con primocolonización.....	64
3. Cepas clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	65
3.1 Procedimiento de siembra e identificación	65
3.2 Cepas control.....	68
4. Estudios de sensibilidad antimicrobiana.....	69
4.1 Sensibilidad planctónica.....	69
4.2 Pruebas de sensibilidad en biopelícula	69
5. Determinación de la frecuencia de mutación	74
6. Métodos empleados en epidemiología molecular	75
6.1 Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)	75
6.2 MultiLocus Sequence Typing (MLST).....	77
6.3 rep-PCR DiversiLab	79
6.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	80
7. Estudio de la detección precoz de <i>P. aeruginosa</i>	86
7.1 Selección de pacientes y muestras	86
RESULTADOS	89
1. EVOLUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN EN PACIENTES DE LA UNIDAD DE FQ.....	91
1.1. Patrón general y evolución de la colonización broncopulmonar	92
1.2. <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con FQ.....	95
2. PACIENTES CON PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>	91

2.1	Características clínicas de los pacientes.....	91
2.2	Características microbiológicas.....	100
2.2.1	<i>P. aeruginosa</i> y co-colonización	101
2.3	Sensibilidad antimicrobiana	104
2.3.1	Estudios de sensibilidad antibiótica planctónica	104
2.3.2	Sensibilidad antibiótica en biopelícula.....	106
2.4	Determinación de la frecuencia de mutación	110
2.4.1	Estudio de hipermutación en <i>P. aeruginosa</i> de primocolonización	112
2.4.2	Evolución de la frecuencia de mutación en el mismo paciente	113
2.5	Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)	114
2.5.1	Cepas de primocolonización	114
2.5.2	Resultados de PFGE de las cepas de primocolonización y seguimiento.....	114
2.6	MLST (Multi Locus Sequence Typing).....	117
2.7	Rep-PCR DiversiLab	121
2.8	Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	124
2.9	Comparación PFGE y MLST.....	127
2.10	Comparación PFGE, MLST, DiversiLab y MALDI-TOF.....	128
3.	DETECCIÓN PRECOZ DE <i>P. aeruginosa</i>	131
	DISCUSIÓN.....	137
	CONCLUSIONES	163
	ABREVIATURAS.....	167

LISTADO DE FIGURAS	177
LISTADO DE TABLAS	181
BIBLIOGRAFÍA	183
ANEXO I. FICHAS DE PACIENTES CON PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>	207
ANEXO II. SUMMARY	235
ANEXO III. PUBLICACIONES	241



INTRODUCCIÓN

1. Fibrosis quística

La fibrosis quística (FQ) es la enfermedad hereditaria potencialmente letal más frecuente de la raza caucásica (Ratjen & Doring, 2003). En la población europea existe una frecuencia entre 1/2000 y 1/6000 por cada recién nacido vivo. Se desconoce la incidencia global en España, aunque existen datos en algunas Comunidades Autónomas como por ejemplo en Cataluña (1/5500) o Castilla-León (1/4000) (Tellería Orriols y cols., 2002). Así mismo, se considera como la causa más frecuente de enfermedad pulmonar progresiva, de casi todas las insuficiencias pancreáticas en la infancia y de trasplante pulmonar en este mismo período.

1.1. Antecedentes históricos

Las primeras alusiones a la FQ aparecen en el folclore popular del Norte de Europa cuando se refieren a niños con “un sabor salado al besarles, que estaban embrujados y morían pronto”. El término “fibrosis quística del páncreas” lo acuñó Dorothy H. Andersen en 1938 después del estudio de órganos procedentes de autopsias, mientras que el vocablo “mucoviscidosis” fue utilizado por primera vez por Farber en 1944.

Di Sant’Agnese, Perea y Ethel Shea describieron una eliminación anormal de sodio y cloro por las glándulas sudoríparas después de que una ola de calor en Nueva York produjera, en muchos pacientes diagnosticados de esta enfermedad, deshidratación con alcalosis hipoclorémica (1952). Andersen y Hodges (1954) descubrieron que la FQ presentaba una herencia autosómica recesiva y la localización del gen responsable de esta enfermedad fue posible tras los estudios llevados a cabo por Lap-Chee Tsui y John R. Riordan, del Hospital for Sick Children (Toronto), y Francis S. Collins de la Universidad de Michigan en 1989.

1.2. Fisiopatogenia

La FQ aparece como consecuencia de una mutación en el gen regulador de la conductancia transmembrana (CFTR-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator; ABCC7; MIM#219700) localizado en el brazo largo del cromosoma 7, en la región 7q31.2 (Rommens, y

cols., 1989). Su secuencia genómica abarca 190 kb y está organizada en 27 exones o secuencias codificantes. La nomenclatura de las mutaciones señala el tipo de alteración y su posición en el gen o la proteína. En el periodo 1989-2012 se han documentado más de 1900 mutaciones en el Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística (CFGAC, <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), siendo la más frecuente la pérdida del triplete CTT que determina la delección de la fenilalanina en el codón 508 (F508del). Esta mutación representa $\approx 70\%$ de todas las mutaciones en la población caucásica (ECFSPR Annual Report 2010, Zolin A y cols., 2014). En España está presente en el 51% los pacientes con FQ (Alonso y cols., 2007).

Como consecuencia de la mutación en el gen CFTR, se origina una alteración en la producción y función de una glicoproteína perteneciente a la familia de transportadores ABC (ATP-Binding cassette transporter superfamily) (Aleksandrov, Aleksandrov & Riordan, 2007).

En condiciones normales, esta proteína se expresa en la membrana apical de las células epiteliales y exocrinas de múltiples órganos y sistemas: páncreas, intestino, sistema hepatobiliar, glándulas sudoríparas, sistema genitourinario y tracto respiratorio (Engelhardt y cols., 1994). El defecto de la proteína CFTR causa un transporte anormal de iones a través de la superficie apical del epitelio, de tal manera, que se produce un desequilibrio en la concentración de electrolitos, una deshidratación de las secreciones y en consecuencia una obstrucción de los conductos. Los dos órganos más afectados son el pulmón, donde la secreción espesa, deshidratada y gruesa que se produce altera los mecanismos de aclaramiento mucociliar en la superficie de las células pulmonares (Donaldson y cols., 2006) y el páncreas. De este modo, la insuficiencia pancreática y la enfermedad pulmonar crónica son las manifestaciones clínicas más características de esta enfermedad (Davis y cols., 1996).

El tracto respiratorio normal, desde las fosas nasales a los bronquiolos terminales, está tapizado por un epitelio revestido de una delgada capa líquida en la que se distingue una fase periciliar, con baja viscosidad para que los cilios puedan batir sin dificultad, y otra capa mucosa, más externa, en donde el moco es más abundante y la

diversidad de los carbohidratos dentro del gel de mucina permite atrapar una gran variedad de partículas y eliminarlas de la vía aérea.

En el tracto respiratorio de los pacientes con FQ, como se ha comentado anteriormente, el funcionamiento alterado de la proteína CFTR da lugar a un transporte anormal de cloro y sodio, que de forma secundaria altera también el transporte del agua a través de la superficie líquida del epitelio (SLE) (Davis, Cystic fibrosis since 1938, 2006). Se han postulado diferentes hipótesis para explicar la alteración de la SLE, que de forma secundaria altera los mecanismos de defensa de la vía aérea en estos enfermos, siendo la teoría etiopatogénica del “bajo volumen de la SLE” la que mejor explica esta alteración (Clunes & Boucher, 2007). Esta teoría sugiere que el mayor mecanismo de defensa de la vía aérea es la limpieza mecánica, fundamentalmente debida al aclaramiento del moco por parte de la estructura ciliar (Donaldson & Boucher, Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, 2003; Boucher R. , 2003).

De acuerdo a esta hipótesis, el funcionamiento defectuoso de la proteína CFTR da lugar a una SLE con “poco volumen y poco espesor” (Donaldson y cols., 2006), produciéndose un moco espeso y deshidratado que favorece la adhesión de microorganismos y la posterior infección crónica característica de este trastorno (Boucher R. , 2002). Además, el aclaramiento anormal de la vía aérea da lugar a un aflujo masivo de neutrófilos y de otros mediadores inflamatorios que contribuyen enormemente a la gran viscosidad de las secreciones, siendo este daño una de las mayores causas de bronquiectasias y destrucción de la vía aérea en FQ (Davis, Cystic fibrosis since 1938, 2006).

En resumen, en la vía aérea de los pacientes con FQ se reúnen una serie de factores que impiden el aclaramiento y la fagocitosis de los microorganismos que alcanzan el tracto respiratorio, con lo que se favorece el sobrecrecimiento de los mismos y la aparición de infecciones pulmonares crónicas, inflamación y bronquiectasias que conducen a un deterioro progresivo de la función pulmonar que lleva a fallo respiratorio y a la muerte.

1.3.Alteraciones en la proteína CFTR

La alta homología observada entre proteínas CFTR de diferentes especies y el preciso mecanismo requerido para la regulación de CFTR sugieren que cualquier pequeña alteración en la secuencia del gen puede repercutir en la síntesis y/o estructura de la proteína, modificando su función normal en un grado variable. Por tanto, el impacto de una mutación depende del tipo de alteración, la región comprometida y la actividad residual de la proteína mutada (Casals, 2008) (Figura 1).

Las mutaciones que determinan un codón de parada (*nonsense*, G542X), un cambio en la pauta de lectura (*frameshift*; 2183AA>G) o afectan la definición del exón variando alguna secuencia consenso (*splicing*; 712-1G>T) producen proteínas truncadas o transcritos inestables que son rápidamente degradados. Estas mutaciones con ausencia total de proteína constituyen la clase I.

En la clase II, la mutación modifica la cadena polipeptídica de forma que ésta no puede adquirir la conformación adecuada. Durante el proceso de maduración, estas proteínas son reconocidas por chaperonas y eliminadas en el retículo endoplasmático. La mutación F508del es la más representativa de esta clase.

Otras mutaciones determinan la sustitución de un solo aminoácido y producen cambios estructurales que no siempre impiden el anclaje de la proteína en la membrana celular, pero si pueden alterar la regulación de apertura-cierre del poro (clase III, G551D) o su conductividad (clase IV; R334W).

Finalmente, las mutaciones que crean nuevas señales de *splicing* producen transcritos aberrantes en un porcentaje variable, con tamaño distinto al normal, que por lo general son inestables. Estas mutaciones de clase V, conservan la síntesis de proteína normal, aunque en menor proporción.

Al margen de algunas excepciones, las mutaciones de clase I, II y III se asocian con presentaciones clínicas graves, mientras que las mutaciones de la clase IV y V, al mantener una actividad residual se asocian a fenotipo más leves (Welsh & Smith, 1993)

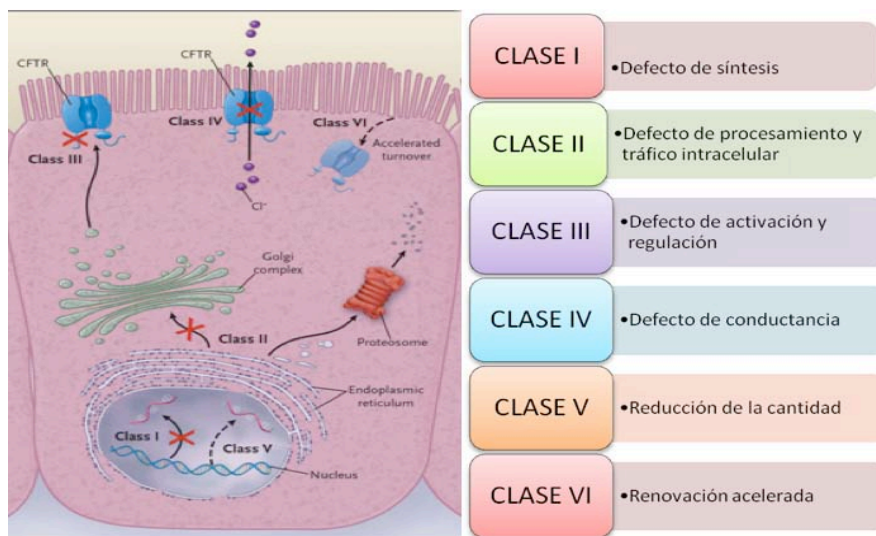


Figura 1. Clases de mutaciones de la proteína CFTR.

La prevalencia de estas mutaciones está en función de la etnia, el área geográfica y las corrientes migratorias. La población del área mediterránea tiene una elevada heterogeneidad de mutaciones en el gen CFTR. Concretamente, España es uno de los países con mayor heterogeneidad molecular ya que se han detectado más de 121 mutaciones que representan el 96% de los alelos descritos en FQ (Alonso, y cols., 2007).

1.4. Respuesta inflamatoria

Hasta hace poco existían dudas sobre la causa del proceso de inflamación local en el paciente con FQ, esencialmente en relación a si éste se produce con anterioridad a la colonización patogénica o si es consecuencia de ella. Los datos actuales indican que el proceso inflamatorio está presente incluso en los pacientes clínicamente estables y en los niños diagnosticados por cribado neonatal y sin colonización bacteriana aparente (Sly, y cols., 2009). No obstante, también existe un aumento de la inflamación local tras la colonización con mediadores de la inflamación y neutrófilos, creándose un círculo vicioso con una ineficiente eliminación de los microorganismos (Figura 2)

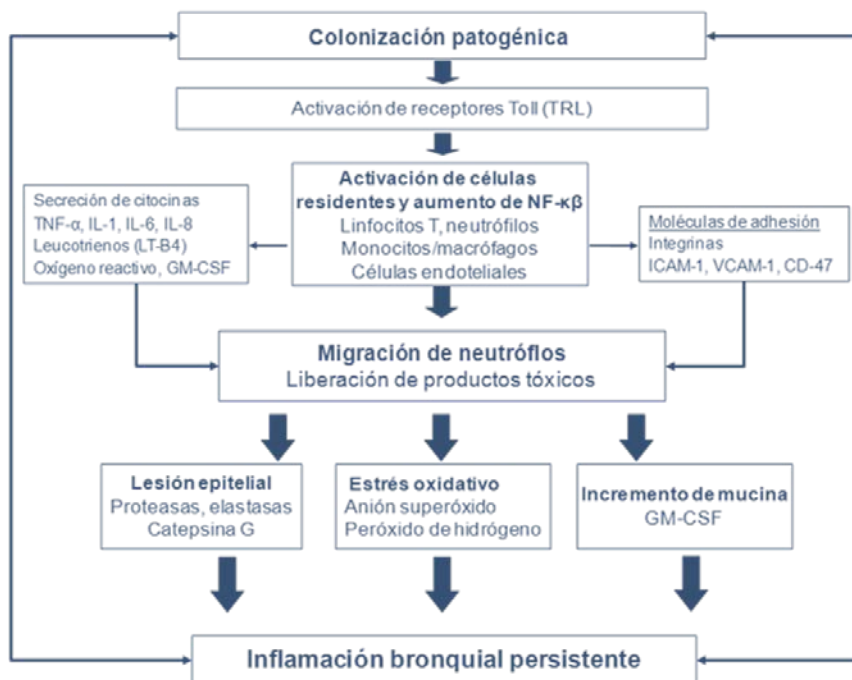


Figura 2. Respuesta inflamatoria local en la mucosa respiratoria en pacientes con fibrosis quística con colonización patogénica.

Modificada de ref. Cantón & Fernández- Olmos, 2012

La primera línea de defensa contra la infección en la vía aérea es la respuesta inmunitaria innata junto con la eliminación mucociliar. El líquido que reviste el epitelio respiratorio se compone de proteínas y péptidos (lisozima, lactoferrina, fosfolipasa A2) con actividad antibacteriana. En la FQ no existe déficit en su producción pero se ha descrito una disminución en una proteína (mannose-binding lectin) relevante en la inmunidad innata tanto de bacterias como de virus que participa en la activación del complemento y la fagocitosis (Chmiel & Konstan, 2007). Esta hipótesis admitiría que la inflamación en la vía aérea del paciente con FQ estaría presente desde los primeros meses de vida, incluso antes de la colonización y no como consecuencia de ella.

En pacientes no colonizados se ha constatado la presencia de bajas concentraciones en lavados broncoalveolares de interleuquina (IL)-10, una citoquina antiinflamatoria cuyo déficit influiría en la inflamación pulmonar crónica severa (Sagel, y cols., 2007). Asimismo, existen evidencias que demuestran que la alteración del CFTR no solo se produce en las células epiteliales del árbol bronquial sino también en las células que participan en la respuesta inflamatoria, creándose un desbalance en la cascada de los mediadores proinflamatorios (Rubin, 2007) (Brennan, 2008). En cuanto a la respuesta humoral, ésta no estaría alterada, pero la exposición reiterada a los antígenos por *P. aeruginosa* durante la colonización crónica por esta bacteria produciría una falta de maduración de los anticuerpos anti-*P. aeruginosa* con lo que disminuiría las posibilidades de su eliminación.

Un aspecto esencial en el deterioro pulmonar progresivo se produce por el acúmulo masivo de células inflamatorias en el epitelio bronquial, esencialmente neutrófilos (Buchanan, y cols., 2009). El ADN libre tras la lisis celular incrementa la densidad y la viscosidad de las secreciones, dificultando su eliminación. Además, los neutrófilos, mediante la secreción de proteasas, elastasas y productos oxidativos dañarían aún más el tejido bronquial. Asimismo, estos productos estimularían la producción de mucina, aumentando aún más la viscosidad de las secreciones y la obstrucción de la vía aérea. En este proceso también se alterarían los receptores fagocíticos de los macrófagos, facilitando la persistencia bacteriana y de los neutrófilos apoptóticos. Por otro lado, se incrementa la producción de IL-8 que a su vez participa en el reclutamiento de los neutrófilos (Jacquot, Tabary, Le Rouzic, & Clement, 2008). El hallazgo de neutrófilos en las primeras fases de la enfermedad (en pacientes sin colonización estable) sugeriría un equilibrio entre la presencia de los microorganismos y los procesos defensivos del huésped (Jacquot, y cols., 2008).

En *P. aeruginosa* se han reconocido diversos sistemas y componentes celulares que activan la cascada de mediadores de la inflamación, entre ellos el lipopolisacárido (LPS), los componentes flagelares y los sistemas de secreción tipo III (Buchanan, y cols., 2009). También que la resistencia

a la colonización por *P. aeruginosa* requiere la liberación de IL-1 β , proceso modulado por el CFTR, no siendo funcional en las células con CFTR deficiente. Los microorganismos patógenos favorecen claramente la liberación de citoquinas con actividad proinflamatoria y favorecedoras del infiltrado de neutrófilos, particularmente IL-8. Sin embargo, el efecto fagocítico se ve en parte frustrado por la presencia de exoproductos de los microorganismos (exopolisacáridos y enzimas proteolíticas) y su crecimiento en forma de biopelículas.

Utilizando cultivos de células con mutaciones típicas de la FQ se ha demostrado que, como consecuencia de la alteración del CFTR del retículo endoplásmico, se afecta el almacenamiento del Ca²⁺, cuyo aumento facilita la síntesis de IL-8 (Figura 2). Otra vía diferente que puede activar la cascada de las citoquinas proinflamatorias es el estrés oxidativo, también debido al intenso infiltrado de neutrófilos y a los compuestos oxidativos liberados que favorecen la síntesis de IL-8.

1.5. Manifestaciones clínicas

Su presentación clínica es muy variable, lo que ocasiona que el diagnóstico tardío no sea infrecuente. Existen varios cuadros clínicos que se detallan a continuación:

- A. Enfermedad sinopulmonar crónica: colonización/infección bronquial persistente por patógenos típicos de la FQ (*Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *P. aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*), tos y expectoración crónicas, alteraciones persistentes en la radiografía de tórax (bronquiectasias, atelectasias, infiltrados, hiperinsuflación, sobre todo en los lóbulos superiores), obstrucción de la vía aérea con sibilancias y atrapamiento aéreo, pólipos nasales y/o anomalías radiológicas de los senos paranasales (pansinusitis radiológica) y la existencia de acropaquias.
- B. Alteraciones gastrointestinales y nutricionales: Intestinales (íleo meconial, síndrome de obstrucción intestinal distal, prolapso rectal), pancreáticas (insuficiencia pancreática exocrina, pancreatitis recurrente), hepáticas (cirrosis biliar focal o cirrosis multilobular), nutricionales (malnutrición proteico-calórica, hipoproteínemia y

edemas, retraso pondero-estatural, complicaciones secundarias a deficiencia de vitaminas liposolubles).

C. Síndromes debidos a la pérdida excesiva de sal por el sudor: deshidratación hipotónica, alcalosis metabólica crónica.

D. Azoospermia obstructiva en el varón por ausencia congénita bilateral de conductos deferentes.

La afectación pulmonar constituye la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con FQ (90% de los casos) (Saiman & Siegel, 2004) (Chmiel & Davis, 2003) (Moore, y cols., 2004). Además de la colonización bacteriana crónica, los pacientes con FQ presentan con frecuencia episodios de exacerbaciones caracterizados por fiebre, aumento de tos, expectoración distinta a lo habitual, disnea y empeoramiento de la función pulmonar. Las complicaciones respiratorias más importantes serían: atelectasias, neumotórax, hemoptisis y aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA).

1.6. Diagnóstico de FQ

El Consenso europeo (De Boeck, y cols., 2006) establece el diagnóstico de FQ clásica en presencia de al menos una manifestación fenotípica de FQ junto con una concentración de cloro en sudor ≥ 60 mmol/l (Figura 3). Estos pacientes generalmente presentan dos mutaciones causantes de enfermedad en el gen CFTR, pueden tener o no insuficiencia pancreática y su evolución es variable. (Barrio, y cols., 2009)

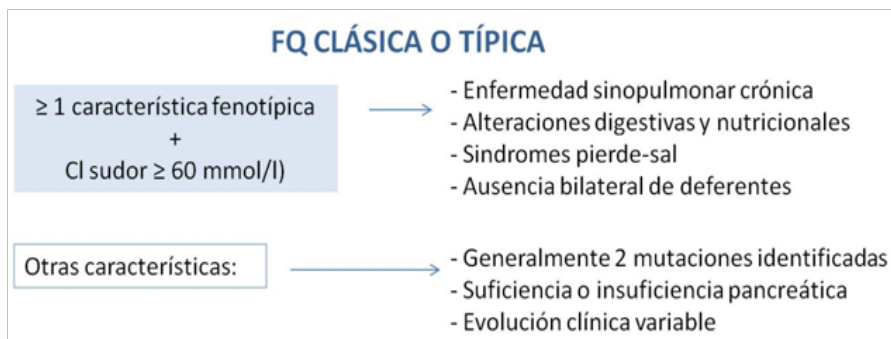


Figura 3. Criterios diagnósticos de FQ clásica.

Modificada de ref. De Boeck, y cols., 2006.

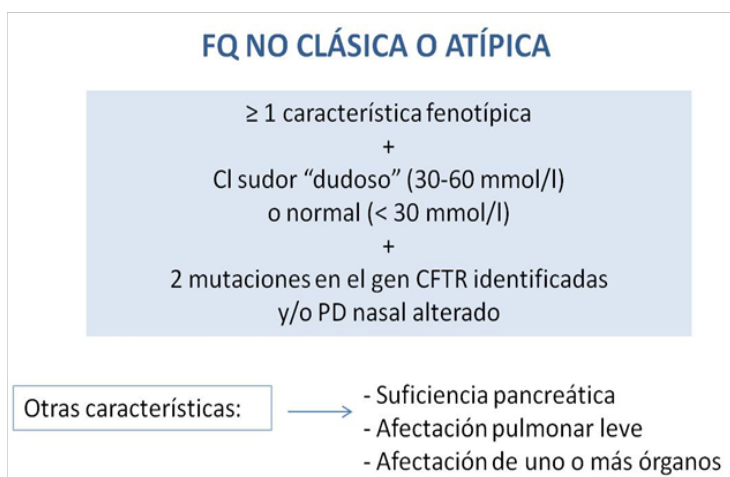


Figura 4. Criterios diagnósticos de FQ no clásica.

Modificada de ref. De Boeck, y cols., 2006.

Debido a la existencia de presentaciones atípicas de la enfermedad (Figura 4), la descripción de casos de FQ con test del sudor negativo y el gran número de mutaciones descritas, se estableció un sistema de consenso para establecer el diagnóstico de FQ (De Boeck, y cols., 2006).

Este consenso propone unos algoritmos sobre la metodología diagnóstica a seguir, partiendo del resultado del test del sudor (Figura 5).

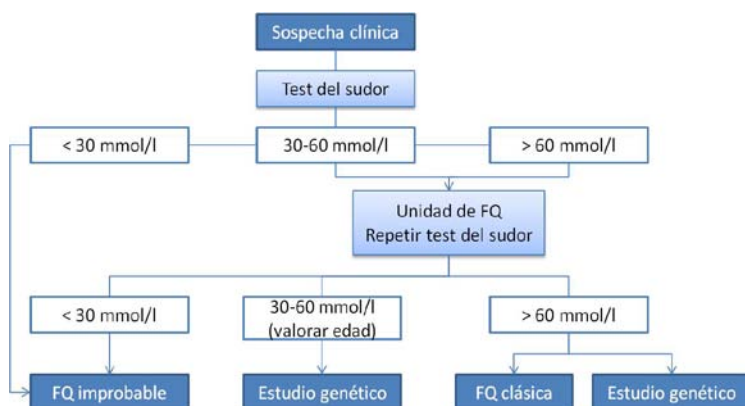


Figura 5. Esquema de protocolo de diagnóstico de la FQ, basado en los síntomas clínicos.

Modificada de ref. (De Boeck, y cols., 2006).

1.7. Cribado neonatal

La FQ cumple los criterios aceptados para ser susceptible de ser incluida en un programa de cribado neonatal (Wilcken, 1999). Adicionalmente, existe un marcador bioquímico adecuado para un diagnóstico barato, sensible y específico, como es el tripsinógeno sérico inmunorreactivo (TIR), que facilita la implantación de programas fiables, adaptados a la población objetivo de cribado. Presenta una muy baja proporción de falsos negativos y una proporción aceptablemente baja de falsos positivos. (Giusti, y cols., 2007) (Giusti, 2008).

En España el primer programa de cribado neonatal de FQ se instauró en Cataluña en el año 1999, y fue seguido por los programas de Baleares y de Castilla y León. Actualmente existen programas de cribado en todas las Comunidades Autónomas.

2. Colonización e infección en el paciente con fibrosis quística

2.1. Colonización patogénica

Existen diferentes hipótesis que tratan de explicar la presencia y el sobrecrecimiento de los microorganismos y la intensa respuesta inflamatoria que se observa en el tracto respiratorio de los pacientes con FQ. Entre ellas destacan a) la inflamación primaria y respuesta inflamatoria exacerbada, b) la presencia de receptores celulares que facilitan la adherencia bacteriana a las células epiteliales y el proceso de inflamación, c) el aumento en la concentración de electrolitos y alteración de las defensinas y d) la disminución del fluido isotónico y moco anóxico. Ninguna de ellas explicaría por sí sola el proceso de colonización persistente pudiendo ser complementarias entre ellas (Cantón & del Campo, Cystic fibrosis: deciphering the complexity, 2010).

Asimismo, en estos pacientes se ha destacado el crecimiento de los microorganismos en la mucosa respiratoria sin invasión de los tejidos, estableciéndose un proceso denominado como “colonización patogénica” que hace referencia al efecto lesivo que se produce como consecuencia del sobrecrecimiento de los microorganismos y el desencadenamiento de un círculo vicioso en el que intervendrían diferentes mediadores de la inflamación (Cantón, y cols., 2005).

En FQ se suele utilizar indistintamente los términos “colonización” e “infección” cuando se hace referencia a la presencia de los microorganismos en la mucosa respiratoria. En general, un estado de “infección” suele indicar un efecto patogénico derivado de la invasión de un tejido, situación que es excepcional (Lyczak, y cols., 2002).

Por el contrario, la colonización se produce sobre una superficie mucosa (crecimiento epimucosa) y la patogénesis se desencadena de manera pasiva por liberación de exoproductos y el efecto inflamatorio local. Por ello, se ha acuñado el término de “colonización patogénica” que define un estado de colonización con efectos patogénicos (Cantón, y cols., 2005).

2.2. Cronología en la aparición de los microorganismos

Son pocas las especies bacterianas asociadas a la colonización/infección patogénica pulmonar en la FQ. Los microorganismos que colonizan la vía aérea de los pacientes con FQ presentan una secuencia temporal relativamente establecida y asociada a la edad del paciente (Figura 6). Durante las primeras etapas de la vida, las infecciones víricas propias de la infancia (también en el individuo no fibrótico) pueden provocar la denudación del epitelio pulmonar, favoreciendo la colonización bacteriana recurrente y el estado local de inflamación crónico (Prober, 1991).

Se ha demostrado que algunos virus (Adenovirus y Coronavirus) y determinadas bacterias (*Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*) estimulan el sistema fagocítico favoreciendo la descamación del epitelio y la atracción de los neutrófilos (van Ewijk, y cols., 2005). Con ello se favorece la respuesta inflamatoria del tracto respiratorio, que en ocasiones se evidencia antes que los cultivos (Burns, y cols., 2001).

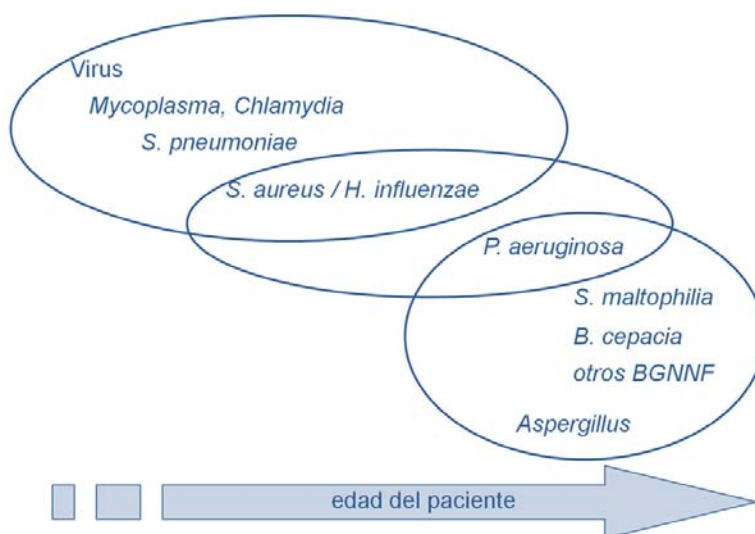


Figura 6. Evolución de los microorganismos que colonizan la vía aérea en el paciente con FQ con el aumento de la edad del paciente.

BGNNF: bacilos Gram negativos no fermentadores.

Tras este período, la colonización más frecuente es la causada por *S. aureus* y *H. influenzae*. También se ha descrito que *Streptococcus pneumoniae* coloniza la mucosa respiratoria en las primeras etapas pero su presencia no es más frecuente que en los niños de igual edad sin FQ (del Campo, y cols., 2005). No obstante presentan unos perfiles de resistencia a antibióticos mayores.

S. aureus es a menudo el patógeno que inicia el proceso de colonización crónica característico de FQ, aunque suele ser difícil establecer su relación con el deterioro pulmonar (McCaffery, y cols., 1999). Recientemente ha aumentado la prevalencia de aislados de *S. aureus* resistentes a la meticilina (SARM) (Sawicki, y cols., 2009), y aunque en su mayoría se relacionan con una adquisición nosocomial, también se han descrito clones de SARM comunitarios de mayor virulencia, cuya emergencia en la FQ es preocupante por el mayor deterioro de la función pulmonar que podrían ejercer.

H. influenzae se detecta principalmente en niños, pero aparecen con menor frecuencia. Aunque tiene un papel patogénico secundario, también podría contribuir al daño tisular al exacerbar la respuesta inflamatoria pulmonar solamente en virtud de su carga bacteriana (Roman, y cols., 2004). La mayor incidencia de aislamiento de este microorganismo ocurre en niños pequeños aunque puede extenderse a edades más avanzadas en casos de cepas persistentes. Su presencia y su papel patógeno está demostrado en las exacerbaciones agudas (Roman, y cols., 2004). Las infecciones por *S. aureus* y *H. influenzae* predisponen generalmente al pulmón afectado de FQ a la colonización con *P. aeruginosa*.

Conforme avanza la edad del paciente y la progresión de la enfermedad, aumenta el aislamiento de *P. aeruginosa* (Hauser, y cols., 2011) (Lipuma, 2010). Este microorganismo es el agente infeccioso más frecuentemente involucrado en la infección crónica pulmonar en FQ (34). Se aísla en el 60% de los pacientes con FQ, especialmente en adultos, en donde puede alcanzar cifras de hasta el 80% (35). El inicio de la colonización/infección por *P. aeruginosa* tiene una enorme relevancia en la evolución y el pronóstico del paciente con FQ, por tanto la prevención

y el tratamiento de las infecciones son fundamentales. El pronóstico de la enfermedad está estrechamente relacionado con el inicio de la colonización crónica por *P. aeruginosa* (36, 37) y este pronóstico del paciente es peor cuanto más temprano ocurre esta colonización (Emerson, y cols., 2002) (Kosorok, y cols., 2001).

Otras especies bacterianas que aparecen con menor frecuencia son *Burkholderia cepacia*, *Achromobacter* (*Alcaligenes*) *xylosoxidans* o *Stenotrophomonas maltophilia*. Estas últimas tienen un interés creciente (Valdezate, y cols., 2001). Estos microorganismos Gram negativos no fermentadores pueden marcar un peor pronóstico de la enfermedad ya que afecta a pacientes de mayor edad y dificultan la respuesta al tratamiento antimicrobiano por la multirresistencia que acompaña a estos microorganismos.

En el caso concreto de *A. xylosoxidans*, se ha demostrado recientemente que causan infecciones respiratorias persistentes e inflamación en pacientes con FQ de forma similar a *P. aeruginosa* (Hansen, y cols., 2010)

En el caso de *B. cepacia* puede desarrollarse el denominado “síndrome cepacia” que conlleva un importante, rápido y fatal deterioro de la función pulmonar (Drevinek & Mahenthiralingam, 2010). La diferenciación a nivel de especie dentro del complejo *Burkholderia cepacia* complex, como *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia cepacia* and *Burkholderia multivorans*, está recomendado no solo para el manejo clínico del paciente si no también para adoptar las mejores medidas de control de la infección limitando su transmisión entre pacientes (Biddick, y cols., 2003). En los pacientes con FQ también se aísla *Burkholderia gladioli*, una especie no perteneciente al complejo de *Burkholderia cepacia* complex.

Junto a estos se han aislado también otros considerados como patógenos emergentes por algunos autores entre los que se incluyen *Pandora spp*, *Inquilinus limosus*, *Rhialstonia spp*, *Dolosigranulum pigrum* y *Dialister pneumosintes* (Coenye, y cols., 2002). La aplicación de métodos moleculares y de técnicas de proteómica (espectrometría de

masas MALDI-TOF) en los Laboratorios de Microbiología ha facilitado la identificación de estos patógenos, algunos con dificultades previas por la problemática diferenciación con las especies del *B. cepacia* complex. No obstante, su adscripción patogénica es incierta y son necesarios aún más estudios que definan su relevancia y participación en el deterioro pulmonar (Bittar & Rolain, 2010).

Se han descrito también aislamientos de enterobacterias en la vía aérea de los pacientes con FQ como *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. y *Proteus*. Se aislaron con mayor frecuencia en menores de 5 años, aunque no se asociaron a enfermedad grave (Oliver, y cols., 2009).

En los últimos años se ha contemplado la relevancia de los anaerobios y su papel patogénico en la FQ (Tunney y cols., 2008). Su presencia no se investiga habitualmente en las muestras respiratorias pero algunos estudios demuestran que pueden colonizar la mucosa respiratoria del paciente con FQ presentando una alta carga bacteriana. Así, podrían actuar como coadyuvantes de la inflamación, siendo indicadores de este proceso y pueden ejercer un efecto pasivo en la patogenia de la colonización (Zemanick, y cols., 2011).

Además, en los pacientes adultos o multitratados con antimicrobianos no es raro encontrar en el tracto respiratorio *Aspergillus* spp, generalmente *Aspergillus fumigatus* y diversas especies de *Candida*. Mientras que estas últimas suelen considerarse microorganismos saprofitos sin interés clínico, *A. fumigatus* se asocia con la producción de aspergilosis broncopulmonar alérgica (ABPA). Otros hongos con importancia epidemiológica en estos pacientes son *Scedosporium apiospermum*, que podría favorecer un síndrome similar al ABPA (Lipuma, 2010), y *Pneumocystis jiroveci* que podría comportarse exclusivamente como colonizador del tracto respiratorio, aunque no se descarta un papel secundario relevante en la respuesta inflamatoria local (Montes-Cano, y cols., 2007). Por último no es infrecuente en los pacientes también multitratados el aislamiento de micobacterias atípicas sobre todo *Mycobacterium avium* siendo excepcional el aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* (Lipuma, 2010).

Es importante resaltar que en la mayoría de los pacientes (~70%), el patrón de colonización bronquial no siempre es monomicrobiano, coexistiendo diferentes patógenos. En más del 50% de ellos aparecen simultáneamente *S. aureus* y *P. aeruginosa*, solos o en asociación con *H. influenzae* o *S. pneumoniae* y pueden existir sobrecolonizaciones con bacilos Gram negativos multirresistentes o patógenos emergentes, siendo difícil establecer los tratamientos antimicrobianos (Lipuma, 2010).

En resumen, a lo largo de la vida de los enfermos con FQ se producen colonizaciones e infecciones crónicas del tracto respiratorio por distintos patógenos (Oliver, y cols., 2009) como se muestra en la distribución por grupos de edad de los principales microorganismos aislados en la FQ: *P. aeruginosa*, *S. aureus* y SARM, *H. influenzae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *B. cepacia* (CFF, 2012)

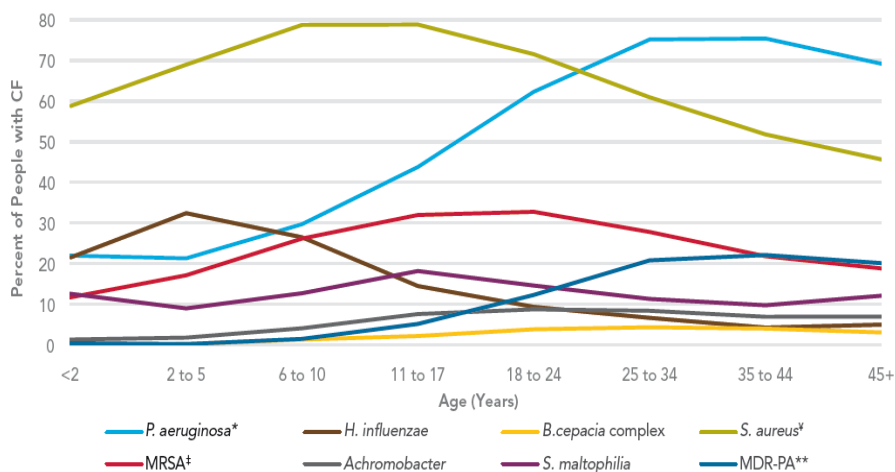


Figura 7. Colonización/infección pulmonar en los pacientes con FQ por grupos de edad.

Datos del Registro Nacional de Pacientes de la Cystic Fibrosis Foundation de EE.UU., 2012. (CFF, 2012)

La evolución en el tiempo, calidad de vida y expectativa de supervivencia de los pacientes con FQ son inversamente proporcionales al número anual de exacerbaciones y a la carga de microorganismos en las secreciones respiratorias (Saiman & Siegel, Infection control in cystic fibrosis, 2004). El avance en la terapia antibiótica es uno de los factores que más ha influido en el aumento de su supervivencia y mejora de la calidad de vida de los pacientes con esta enfermedad, de tal manera, que la FQ ha pasado de ser una enfermedad exclusivamente pediátrica a ser también del adulto.

3. *Pseudomonas aeruginosa*

3.1. Características microbiológicas

El género *Pseudomonas* pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, que se sitúa dentro del orden *Pseudomonadales*, que además comprende la familia *Moraxellaceae*.

Pseudomonas es un bacilo Gram negativo aerobio, no fermentador, positivo en la prueba de la oxidasa y la catalasa y móvil, debido a la presencia de un flagelo polar. Crece en agar MacConkey formando colonias claras debido a su condición de no fermentador de lactosa. Algunas cepas de *Pseudomonas* producen pigmentos difusibles como la pioverdina (amarillo verdoso), la piocianina (azul verdoso), la fluoresceína (amarillo) y la piorrubina (rojo-pardo). Su temperatura óptima de crecimiento es de 35 °C pero puede hacerlo a 42 °C.

El género *Pseudomonas* es bien conocido por su versatilidad metabólica y plasticidad genética. Es un microorganismo muy ubicuo que se puede encontrar en el suelo, materia orgánica en descomposición, vegetación y agua. Se encuentran también en el ambiente hospitalario en reservorios húmedos como en los equipos de terapia respiratoria, en los equipos de diálisis, alimentos e incluso en las soluciones desinfectantes (Morrison & Wenzel, 1984). La amplia distribución ambiental de esta bacteria esta favorecida por sus escasos requerimientos nutricionales para su desarrollo, incluso con capacidad de crecer en el agua destilada, ya que es capaz de utilizar muchos compuestos orgánicos como fuentes de carbono y de nitrógeno. Por tanto, tienen capacidad de crecer prácticamente en cualquier medio y de resistir la mayoría de los antimicrobianos empleados habitualmente.

La morfología de la colonia, la pigmentación y las propiedades de movilidad pueden ser bastante heterogéneas en *P. aeruginosa*. Los aislados presentes en el tracto respiratorio del paciente con FQ muestran características distintas a aquellos que causan infección aguda en individuos sin FQ. Así, en las fases precoces poseen un fenotipo muy similar al que aparece en los aislados ambientales.

3.2. Epidemiología e importancia clínica

Las infecciones causadas por *Pseudomonas* tienen un carácter primariamente oportunista, aunque pueden representar entre el 10 y el 20% de las infecciones intrahospitalarias, especialmente asociadas con enfermedades neoplásicas o quemaduras severas.

En pacientes sin FQ, *P. aeruginosa* se considera como un microorganismo esencialmente de adquisición hospitalaria transmitido por contacto, mientras que la transmisión aérea no juega un papel importante. El empleo de antimicrobiano puede modificar la microbiota orofaríngea normal, facilitando su colonización por microorganismos entre ellos *P. aeruginosa* y este parece ser el paso previo para la posterior colonización bronquial. La presencia de este microorganismo en la orofaringe de personas sanas es poco frecuente (0- 6,6 %) (Morrison & Wenzel, 1984). Se han descrito casos de infección bronquial y de neumonía nosocomial a partir del empleo de equipos de aerosolterapia contaminados (Cobben, y cols., 1996).

La prevalencia de *P. aeruginosa* en pacientes FQ ha descendido en EEUU desde el 60% en 1995 al 56% en 2005 (Figura 8). A partir de los 10 años de edad, supera en incidencia a *S. aureus* y cuando los pacientes sobrepasan los 35 años está presente en más del 80% de los casos (Razvi, y cols., 2009). Coloniza los alvéolos pulmonares, el epitelio faríngeo y los senos paranasales, existiendo receptores específicos para esta bacteria en las células epiteliales del árbol respiratorio. A su vez, se adapta adecuadamente en el ambiente del alveolo pulmonar por su capacidad de producir toxinas y otros mecanismos de patogenicidad (Hogardt & Heesemann, 2010). Dentro de los numerosos morfotipos que puede presentar, el mucoso es sin duda el más característico de la infección pulmonar del paciente con FQ.

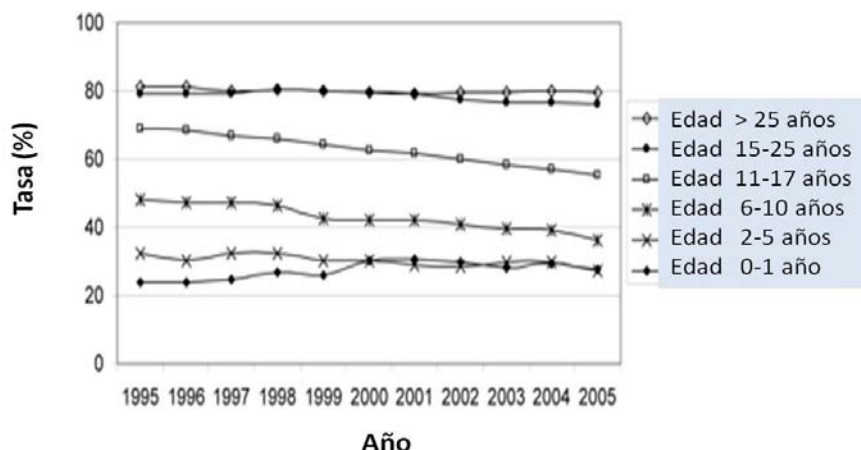


Figura 8. Prevalencia de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ de diferentes edades, de 1995 a 2005 en EEUU.

Modificada de ref. Razvi y cols., 2009.

Cuanto más prolongado sea el periodo de colonización más difícil es su erradicación. Los resultados de los estudios genotípicos realizados en la década de 1990 evidenciaron que la colonización crónica del árbol bronquial es típicamente debida a un escaso número de cepas, es decir, cada enfermo tiene “su propio linaje” de *P. aeruginosa* que tiende a persistir (Mahenthiralingam, y cols., 1996) (Römling y cols., 1994) (Struelens, y cols., 1993).

3.3. Primocolonización

En algunos pacientes, la colonización inicial o primocolonización por *P. aeruginosa* se produce a una edad muy temprana, incluso durante los tres primeros años de vida, aunque lo habitual es que suceda en edades más tardías. Los aislados obtenidos en los cultivos de las secreciones, bien del trato respiratorio inferior o de exudados faríngeos, en las fases precoces poseen un fenotipo muy similar al que aparece en los aislados ambientales, es decir se asocian a morfotipos no mucosos, especialmente al morfotipo rugoso, son móviles, sensibles a los antimicrobianos y con lipopolisacáridos lisos (Lyczak, y cols., 2002) (Renders, y cols., 2001).

La detección microbiológica de la colonización inicial por *P. aeruginosa* en el paciente con FQ es esencial, ya que en esta fase es aún posible la erradicación con tratamientos agresivos, generalmente combinando la administración oral y en aerosoles (Rosenfeld, y cols., 2001) (Milla & Warwick, 1998).

Después de un primer cultivo positivo se produce un periodo denominado de colonización esporádica en la que los cultivos suelen ser intermitentemente positivos y negativos con aumento progresivo de los recuentos bacterianos y posible aparición de morfotipos mucosos que coexisten con otras con diferentes morfotipos coloniales aunque suelen conservar los flagelos y la movilidad. La superficie de mucosa afectada suele ser baja por lo que no siempre los cultivos son positivos aunque pueden detectarse los microorganismos aplicando técnicas de Microbiología Molecular. Los aislados suelen conservar su sensibilidad a los antimicrobianos (Burns, y cols., 2001).

El origen de los aislados de *P. aeruginosa* en la primocolonización suele ser ambiental aunque se han demostrado situaciones en los que se producen transmisiones cruzadas entre pacientes y adquisición durante la estancia en el hospital. La aplicación de técnicas de Microbiología Molecular ha demostrado una gran variabilidad entre aislados, aunque también se ha observado la persistencia de los mismos genotipos en el ambiente familiar, muchos de ellos en zonas húmedas (baños, sumideros, etc) (Schelstraete, y cols., 2008). Se han descrito cepas epidémicas hipertransmisibles que se asocian a un a un mayor deterioro de la función pulmonar. Estas cepas se han detectado en Alemania, Gran Bretaña, Canadá o Australia (Lipuma, 2010).

Algunas de estas cepas hipertransmisibles se caracterizan además por una mayor resistencia a los antimicrobianos. La asistencia a campamentos y lugares de convivencia entre pacientes eleva el riesgo de adquisición de las cepas hipertransmisibles mientras que la aplicación de protocolos de segregación reduce la transmisión de paciente a paciente y por tanto la posible primocolonización.

3.4. Evolución de la colonización-infección por *P. aeruginosa*

No existe un intervalo claro entre la primocolonización y la conversión a las formas mucosas; puede llevar desde varios meses a años, incluso los cultivos de las muestras respiratorias pueden ser intermitentes durante un periodo variable. La aparición de las variantes mucosas en intervalos de tiempos diferentes indicaría que está causada por las mutaciones al azar, seguidas por la selección de cepas mucosas en los pulmones de pacientes con FQ (May, y cols., 1991).

Este fenotipo mucoso fue observado en muestras *post mortem* de tejido pulmonar infectado y del material de broncoscopia de pacientes infectados. Fue demostrado que el aspecto mucoso era debido a un material polisacárido, identificado más adelante como alginato. Se han investigado las condiciones que accionan la conversión al fenotipo mucoso y se ha observado que varias condiciones *in vitro*, tales como la limitación de nutrientes, la adición de surfactantes, y los niveles subóptimos de antimicrobianos, pueden dar lugar a la emergencia del morfotipo mucoso (May, y cols., 1991).

Por tanto, las cepas de *P. aeruginosa* sometida a ciertas condiciones es capaz de producir una cápsula de polisacáridos denominada glucocálix o exopolisacárido mucoide (mucoid exopolysaccharide). Está formada por moléculas de ácido manurónico y glucurónico que al repetirse forman una estructura denominada alginato, la cual es capaz de englobar a las bacterias y formar una muralla de protección frente a la acción de los cilios, células fagocíticas, anticuerpos, factores del complemento y antibióticos (40). En biopelículas o biofilms, la bacteria permanece en un estado de semilatenia con poca tensión de oxígeno y replicándose a un bajo nivel.

Se han definido estadios de la infección-colonización por *P. aeruginosa* que son útiles para el manejo del paciente con FQ y el tratamiento antimicrobiano. En la [Tabla 1](#) se indican esquemáticamente las fases que suceden habitualmente en la colonización por este patógeno.

Tabla 1. Estadios de la infección-colonización por *P. aeruginosa* en pacientes FQ. Modificada de Cantón, y cols., 2015.

Estadio	Definición	Criterios microbiológicos	Comentarios
Colonización inicial (primocolonización)	Detección del primer cultivo positivo de <i>P. aeruginosa</i> en el árbol bronquial. No suelen aparecer manifestaciones clínicas, aunque puede existir respuesta inflamatoria.	Primer cultivo positivo de <i>P. aeruginosa</i> .	Un cultivo positivo después de un año de negatividad después de finalizar el tratamiento se considera como una nueva primoinfección. Suelen ser cepas con colonias no mucosas, con escasa diversidad de morfotipos y sensibles a los antimicrobianos. No suele aparecer respuesta inmunológica específica.
Colonización intermitente	Presencia de cultivos intermitentes positivos y negativos para <i>P. aeruginosa</i> en muestras consecutivas tras la infección inicial. Pueden no existir manifestaciones clínicas y suele existir respuesta inflamatoria	≤ 50% de cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> en los 12 meses previos.	Pueden aparecer cepas con colonias mucosas y otros morfotipos. Puede aparecer respuesta inmunológica específica frente a <i>P. aeruginosa</i> .
Colonización crónica	Cultivos positivos persistentes de <i>P. aeruginosa</i> sin signos clínicos nuevos de infección y con respuesta inflamatoria	> 50% de cultivos positivos para <i>P. aeruginosa</i> en los 12 meses previos.	Suele producirse por cepas con colonias mucosas y otros morfotipos. Es el patrón habitual en periodos avanzados de la enfermedad. Existe respuesta inmunológica consistente con la presencia de <i>P. aeruginosa</i> .
Exacerbación	Aparición o aumento de síntomas respiratorios durante el curso de la infección crónica	Cultivo positivo para <i>P. aeruginosa</i> .	Posible aumento del recuento bacteriano.

Conforme avanza el proceso de colonización, *P. aeruginosa* crece en biopelículas o biofilms dificultando el tratamiento con antimicrobianos y los procesos de defensa del hospedador originando que los cultivos microbiológicos sean siempre positivos (colonización crónica), siendo casi imposible su erradicación. Este crecimiento en biopelículas y la compartimentalización del pulmón favorece la coexistencia de diferentes variantes de *P. aeruginosa* que pueden identificarse como morfotipos diferentes en los cultivos de las muestras respiratorias (Cantón, y cols., Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística, 1998). En estas condiciones, es fácil que se produzca una selección de clones

específicos con mejor adaptación, muchos de ellos sin flagelos e inmóviles, con auxotrofías y perfiles variables de sensibilidad, que pueden persistir a lo largo de la vida del paciente con FQ, aún en los casos en los que se produce una falsa erradicación bajo tratamiento con antimicrobianos (Smith, y cols., 2006).

Es en esta fase cuando, debido al estrés medioambiental y al crecimiento en biopelículas, es fácil que surjan variantes hipermutadoras que acumulan mayor resistencia a los antimicrobianos y por tanto son más difíciles de erradicar (Oliver, y cols., 2000) (García-Castillo, y cols., 2011). Con la aplicación de técnicas moleculares se ha demostrado que a pesar de la persistencia clonal de *P. aeruginosa* durante la colonización crónica se producen modificaciones importantes en su genoma debido a procesos de microevolución con acúmulo de mutaciones y alteración de genes necesarios para la colonización inicial, como los flagelares (Nguyen & Singh, 2006). Esta situación podría favorecerse por el carácter hipermutador asociado a los aislados de *P. aeruginosa* en estos pacientes (Oliver, y cols., 2000).

Durante la colonización crónica, se desarrolla una gran masa bacteriana en la superficie de la mucosa respiratoria, responsable en parte de las consecuencias patogénicas de la colonización (patogénesis pasiva) aunque también se liberan exotoxinas bacterianas capaces de alterar el epitelio respiratorio (patogénesis activa). En este período la respuesta inmunológica es consistente con la colonización por *P. aeruginosa* y suele producirse un deterioro de la función pulmonar (Lyczak, y cols., 2002).

Refiriéndose a las consecuencias clínicas, en los primeros momentos, la colonización por *P. aeruginosa* se asocia con una pequeña reducción de la función pulmonar (Hull J, 1998). Es necesario un aumento de la densidad bacteriana y una cronificación del proceso para que se manifieste un claro deterioro de la función respiratoria (Gibson RL, 2003). Se ha comprobado que el cambio del morfotipo no mucoide al mucoide se acompaña de cambios importantes en los parámetros respiratorios (Henry, y cols., 1992) y se asocia con una mayor mortalidad (Nixon, y cols., 2001).

En los individuos con colonización crónica por *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso los recuentos son generalmente más elevados y presentan una mayor resistencia a los antimicrobianos (Hutchison & Govan, 1999). Asimismo, en estos pacientes existen unos valores de FEV₁, significativamente más bajos, peores valores en los sistemas de puntuación de la radiografía de tórax, menor percentil de peso, menor supervivencia y un aumento del número de hospitalizaciones (Nixon, y cols., 2001) (Emerson, y cols., 2002). También puede detectarse un aumento de la población de anticuerpos.

Las exacerbaciones agudas durante la colonización crónica por *P. aeruginosa* se caracterizan por la aparición de signos clínicos de infección e incremento de los títulos de anticuerpos frente a este patógeno. Estas exacerbaciones suelen coincidir con aumentos de la masa bacteriana, objetivable en los cultivos microbiológicos, y con la emergencia de variantes antigénicas que normalmente disminuyen su carácter virulento para favorecer la persistencia (Murray, y cols., 2007).

3.5. Resistencia antimicrobiana e hipermutación

El alto inóculo bacteriano en un nicho en el que se producen modificaciones en la tensión de oxígeno, limitación de nutrientes y estrés medioambiental favorece la selección de mutantes resistentes, sobre todo en las cepas denominadas hipermutadoras (Oliver, y cols., 2000) (Maciá, y cols., 2005). La hipermutación se ha demostrado en las poblaciones de *P. aeruginosa* procedentes de pacientes con FQ, bronquiectasias y EPOC y facilita los fenómenos de adaptación a las condiciones adversas medioambientales y también el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos (Blázquez, 2003). El carácter hipermutador en una población bacteriana se produce cuando la tasa de mutación espontánea es significativamente superior a la normal (de 100 a 1000 veces). La frecuencia habitual en la que se encuentran eventos mutacionales en *P. aeruginosa* suele ser inferior a 1×10^{-8} . En las poblaciones hipermutadoras se encuentran frecuencias de mutación más elevadas que las habituales (5×10^{-6} y 1×10^{-7}) (Oliver, y cols., 2000). Es debido a la alteración de genes que participan en los sistemas de edición

durante la replicación del ADN (sistemas de reparación “mismatch” o MMR) (Driffield, y cols., 2008) (Mena, y cols., 2007).

Desde el punto de vista del tratamiento antimicrobiano la consecuencia inmediata de la hipermutación es el desarrollo progresivo de resistencias a los antimicrobianos. Los mutantes resistentes serían fácilmente seleccionables bajo la acción de los antimicrobianos sobre todo cuando se producen inóculos bacterianos elevados. En el caso de *P. aeruginosa* se generan fácilmente mutantes que son resistentes a las concentraciones que alcanzan los antimicrobianos en el lugar de la infección. Se ha descrito la elevada frecuencia (43%) de cepas de *P. aeruginosa* hipermutadoras en los pacientes con FQ, observándose en estos aislados un mayor porcentaje de cepas resistentes y resistencia múltiple (Oliver, y cols., 2000). La frecuencia de poblaciones mutadoras en *P. aeruginosa* de FQ solo es superada por la encontrada en pacientes con EPOC o con bronquiectasias (Maciá y cols, 2005).

El propio tratamiento antibiótico se considera un factor de estrés que favorece la selección y el aumento de la resistencia a los antimicrobianos, que una vez presente aumentarían la posibilidad de generar mutantes resistentes a antibióticos adicionales.

4. Estrategias de prevención de colonización por *P. aeruginosa*

El objetivo más importante a alcanzar es prevenir o retrasar la colonización crónica por *P. aeruginosa* (Lebecque, y cols., 2006), y por ello la necesidad de técnicas de detección rápidas y sensibles es fundamental para poder instaurar un tratamiento antibiótico agresivo en el momento del primer aislamiento. De forma adicional, mediante el diagnóstico de la enfermedad de FQ en el periodo neonatal se consigue diferir, a menudo durante muchos años, el desarrollo de infección-colonización bronquial crónica por *P. aeruginosa*, debido a que permite una detección y erradicación precoz.

En la mayoría de los casos, los pacientes con colonización temprana por *P. aeruginosa* no presentan casi síntomas y su función pulmonar es normal (Saiman, Microbiology of early CF lung disease, 2004) (Rosenfeld, y cols., 2001). En algunos casos, los parámetros clínicos no son suficientes para diagnosticar precozmente la colonización pulmonar, y para su evaluación se necesitan parámetros analíticos, entre los que destacan la monitorización seriada de anticuerpos frente a *P. aeruginosa*, de gran interés en caso de que exista un programa de cribado neonatal y la posibilidad de actuar precozmente ante la posible adquisición de este microorganismo, incluso de 6 a 12 meses antes de que se objetive en el cultivo microbiológico (West, y cols., 2002). A continuación se detallan las diferentes estrategias que se pueden emplear:

4.1. Vacuna frente *P. aeruginosa*.

Se han desarrollado diferentes vacunas y también anticuerpos monoclonales, pero pocas han alcanzado la utilización clínica. Por el momento, ninguna ha obtenido la autorización de comercialización (Döring & Pier, 2008). En la revisión de la Cochrane de 2008 se llegó a la conclusión de que no se debía recomendar las vacunas (Johansen & Gøtzsche, 2008).

4.2. Profilaxis antibiótica.

El uso profiláctico de antimicrobianos se ha utilizado de forma anecdótica sin que queden claros los beneficios derivados de su utilización (Rajan & Saiman, 2002) (Smyth & Walters, 2001) y por tanto no está recomendado en los pacientes con FQ (Doring, y cols., 2000).

4.3. Inhalación de suero salino hipertónico.

Es sabido que el funcionamiento alterado de la CFTR da lugar a un transporte anormal de cloro y sodio, que de forma secundaria altera también el transporte del agua a través de la superficie líquida del epitelio (SLE) (Davis, Cystic fibrosis since 1938, 2006). Se han postulado diferentes hipótesis para explicar la alteración de la SLE, siendo la teoría etiopatogénica del “bajo volumen de la SLE” la que mejor explica esta alteración (detallada en el apartado 1.2). De acuerdo a esta hipótesis, la idea de añadir a la SLE “un suero con más cantidad de sal”, es decir suero salino hipertónico (SSH), podría ser beneficiosa para aumentar su hidratación, al proporcionar volumen y sal en una misma preparación. A partir de los años 90 numerosos trabajos han comenzado a emplear el SSH de forma inhalada para mejorar el aclaramiento de la SLE en FQ (Eng, y cols., 1996).

Entre los efectos beneficiosos de la inhalación de SSH hipertónico en pacientes con FQ destacan los siguientes:

1. Efecto sobre las propiedades reológicas del moco y mejoría de la obtención de muestras de esputo: disminuye su viscosidad en el momento mejorando su capacidad de transporte (King, y cols., 1997), lo cual permite una mayor disociación del ADN.
2. Efecto sobre el aclaramiento mucociliar: El añadir SSH induce un incremento inmediato de la SLE en los enfermos con FQ, por encima incluso del tamaño normal, que se mantiene a lo largo de unas horas. Este incremento de volumen permite a los cilios realizar de forma adecuada su función de aclaramiento (Donaldson, y cols., 2006). La inhalación de SSH ha demostrado ser eficaz para favorecer el incremento del aclaramiento mucociliar en FQ (Donaldson, y cols.,

2006). Se ha demostrado también que la inhalación de SSH favorece el aumento del aclaramiento en zonas distales del pulmón, que son habitualmente las más afectadas en FQ (Robinson, y cols., 2000).

3. Mejoría de la función pulmonar y disminución de las exacerbaciones pulmonares: Numerosos trabajos han analizado las modificaciones de la función pulmonar secundarias a la inhalación de SSH. En 2006, se describió que el incremento de la función pulmonar a las 4 semanas del inicio del estudio se mantuvo similar durante las 48 semanas de duración del estudio en 164 pacientes mayores de 6 años aleatorizados para la inhalación de SSH al 7% o suero salino fisiológico (Elkins, y cols., 2006). Además permitió demostrar que la inhalación a largo plazo del SSH disminuye el número de exacerbaciones pulmonares. No se ha evidenciado un aumento en la aparición de *P. aeruginosa* (Elkins, y cols., 2006) (Suri, y cols., 2001).

Por todas estas evidencias y a su posible efecto sobre la inflamación pulmonar, en 2007 aparece ya la terapia con SSH en la guía americana (Flume, y cols., 2007) y en 2009 fue recomendada por la Cochrane (Wark & McDonald, 2009).

4.4. Cribado neonatal.

Las estrategias de intervención precoz son esenciales y numerosos estudios han mostrado una evolución mejor en pacientes diagnosticados por cribado neonatal frente a los diagnosticados por los síntomas (Lenney, 2007).

4.5. Detección precoz de *P. aeruginosa*.

4.5.1. Detección por técnicas de PCR

La gran mayoría de los Laboratorios de Microbiología clínica siguen detección *P. aeruginosa* en las secreciones respiratorias del paciente con FQ mediante cultivo, que aunque sigue siendo la técnica de referencia (Deschaght, y cols., 2009), también existen otras como la detección molecular. En la última década, han aumentado mucho los estudios en los que se comparan la especificidad y sensibilidad de los cultivos frente a las técnicas de PCR (Tramper-Stranders, Van der Ent, & Wolfs, 2005;

Deschaght, y cols., 2009). En la [Tabla 2](#) se resume la especificidad para detectar *P. aeruginosa* mediante PCR según el cebador empleado para la PCR. Siete grupos han probado diferentes cebadores buscando un total de 10 genes, obteniendo alta especificidad para todos excepto para *fliC* y con resultados para *oprL* que sugieren su validación con otras condiciones.

En la mayoría de los estudios en que los se compara el cultivo con la PCR se encuentra una tasa de detección por PCR igual o superior al cultivo. El problema aparece cuando *P. aeruginosa* se encuentra en baja concentración, como en el caso de la primocolonización y es necesario utilizar la PCR en tiempo real (qPCR). Desde 2010, se han publicado varios estudios describiendo técnicas para detectar por qPCR precozmente *P. aeruginosa* en baja concentración en muestras respiratorias de pacientes FQ resumiendo los resultados en el artículo de Deschaght (Deschaght, y cols., 2011). En todos los trabajos, se describen casos con resultados de qPCR +/- cultivo -, con un rango entre 0-14% de estas muestras que resultaron ser qPCR +/- cultivo -, y algunos pacientes (19%) acabaron resultando cultivo + en sucesivas muestras. En casi todos los estudios, algunas muestras resultaron ser qPCR -/cultivo +. La sensibilidad se puede afectar por la obtención de la muestra, el tipo de muestra respiratoria, el procesamiento de la muestra (centrifugación, proteinasa K), el método de extracción del ADN, las condiciones de PCR o la elección de la PCR (mejor hidrólisis o hibridación que SYBR-Green) (Zemanick, y cols., 2010).

Tabla 2. Especificidad para detectar *P. aeruginosa* mediante PCR según el cebador Modificada de Deschaght, y cols., 2011.

Autor	Nº Cepas	Especies	Diana	<i>P. aeruginosa</i>	
				Positiva	Negativa
Laveni et al., 2007	74	16	<i>gyrB</i>	59/59	0/15
			<i>toxA</i>	55/59	0/15
			16S-23S rDNA	59/59	0/15
			ITS	59/59	1/15
			16S rDNA	59/59	3/15
			<i>oprI</i>	59/59	2/15
			<i>oprL</i>	59/59	13/15
			<i>fliC</i>	59/59	0/15
			<i>ecfX</i>	59/59	0/15
De Vos et al., 1997	220	36	<i>oprL</i>	150/150	0/70
Jaffe et al., 2001	58	14	<i>oprL</i>	40/40	0/18
Anuj et al., 2009	91	10	<i>ecfX + gyrB</i>	63/63	0/28
			<i>ecfX</i>	63/63	0/28
			<i>gyrB</i>	63/63	0/28
			<i>oprL</i>	63/63	4/28
			ETA	62/63	0/28
			16S rDNA	63/63	2/28
Qin et al., 2003	200	5	<i>gyrB</i>	113/113	0/87
			<i>algD</i> GDP	101/113	0/87
			manosa	112/113	1/87
			<i>oprI</i>	108/113	0/87
			ETA	108/113	0/87
Motoshim et al., 2007	224	ND	<i>gyrB</i>	104/104	0/120
Da Silva et al., 1999	202	11	<i>algD</i> GDP manosa	176/176	0/26
Da Silva et al., 2004	54	18	<i>algD</i> GDP manosa	7/7	0/47

4.5.2. Detección de anticuerpos frente *P. aeruginosa*.

El empleo de la serología para pacientes FQ no es un tema novedoso ya que en 1977 se empezó a utilizar en Dinamarca (Hoiby, y cols., 1977) y durante los años 80 y 90 aparecieron varios estudios de comparación empleando ELISA caseros para la detección de anticuerpos frente a diversos antígenos de *P. aeruginosa* como exoproteínas (fosfolipasa C, proteasa alcalina, exotoxina A, elastasa) (Hollsing, y cols., 1987) (Trancassini, y cols., 1999). En 2002 en un estudio en niños diagnosticados por cribado neonatal (West, y cols., 2002), y empleando un ELISA para la detección de IgG, IgM, IgA frente 2 antígenos de *P. aeruginosa* (exotoxina A y elastasa) comprobaron que la colonización pulmonar ocurre de 6 a 12 meses antes que el microorganismo se aísle en muestras respiratorias. Concluyeron que la monitorización de los títulos de anticuerpos puede facilitar el diagnóstico y el tratamiento.

Sin embargo, la serología no se ha implantado en la rutinaria diagnóstica de FQ, especialmente tras la evaluación del primer ELISA comercial en 2006 por dos grupos con resultados “controvertidos” (Tramper-Stranders, y cols., 2006) (Kappler, y cols., 2006). Ambos grupos evaluaron el kit de ELISA comercial (Mediagnost kit) para la detección de IgG, IgM, IgA.

En 2009 se evaluó otro Kit comercial (www.ssi.dk) que detecta 64 antígenos diferentes con alta sensibilidad y que permite caracterizar pacientes en diferentes fases de infección (Pressler, y cols., 2009). Por último, en 2010 apareció un prometedor estudio con pacientes de cribado aunque otra vez el ELISA es no comercial. Empleó un ELISA para la detección de IgG, IgM, IgA frente 3 antígenos de *P. aeruginosa* (lisado celular, exotoxina A, elastasa) con el que la respuesta serológica se anticipa en 6 meses al cultivo positivo (Hayes, y cols., 2010).

4.6. Evaluación microbiológica en el paciente con fibrosis quística.

La “Cystic Fibrosis Foundation” (CFF) de los EEUU recomienda cultivos trimestrales de esputo u orofaríngeos de rutina como monitorización de la colonización de microorganismos potencialmente patógenos (Farrell, y cols., 2008). En España, se recomienda una vigilancia microbiológica

mediante el cultivo de esputos cada 2 meses y en las reagudizaciones respiratorias. En los pacientes incapaces de expectorar se recomienda recoger una muestra de aspirado nasofaríngeo o esputo inducido. Se aconseja tratar de forma individualizada las muestras de estos pacientes en Laboratorios de Microbiología especializados para poder identificar microorganismos no habituales (Barrio, y cols., 2009).

Tras el cribado neonatal es imprescindible realizar un seguimiento microbiológico continuo para detectar la primera colonización por *P. aeruginosa* y emplear un tratamiento antimicrobiano agresivo para intent (Rosenfeld, y cols., 2003) (Frederiksen, y cols., 1999).

Los parámetros microbiológicos deben fundamentarse en el estudio de las características del microorganismo y evaluar la densidad bacteriana, la presencia del morfotipo mucoso y la existencia de cepas multirresistentes o con alta capacidad de transmisión (Da Silva Filho L. , y cols., 2001) (Spencer, y cols., 2000).

Estos datos son útiles para establecer un pronóstico y definir la agresividad del tratamiento. El estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos puede ser de gran ayuda, aunque no siempre es adecuado para predecir el éxito de la terapia antibiótica, ya que la respuesta al tratamiento puede ser variable, con diferencias en los estudios realizados in vivo e in vitro (Smith, Fiel, y cols., 2003). También se recomienda realizar una evaluación clínica, funcional y con técnicas de imagen (Barrio, y cols., 2009).

5. Tratamiento de *P. aeruginosa*

Las estrategias de tratamiento antimicrobiano de la colonización-infección por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ deben contemplar, además del beneficio inmediato producido tras su administración, la repercusión a medio o largo plazo sobre el desarrollo de resistencias y sus consecuencias para el paciente. Se pueden distinguir tres situaciones distintas que requieren una aproximación terapéutica diferente (Canton, y cols., 2005) (Cantón, y cols., 2015): primocolonización, colonización esporádica o intermitente y colonización crónica en fase estable o en fase de exacerbación.

5.1. Tratamiento en la fase de primocolonización

El tratamiento erradicador de la colonización inicial por *P. aeruginosa* debe instaurarse lo antes posible (Frederiksen, y cols., 1999). En los estadios iniciales el inóculo bacteriano en el pulmón del paciente con FQ es menor y las cepas aún no han expresado sus particularidades como el morfotipo mucoso, la hipermutación o la resistencia a múltiples antimicrobianos (Cantón, y cols., 2005). El uso de tratamientos iniciales agresivos consigue altas tasas de erradicación de *P. aeruginosa* (63-100%), por lo que los cultivos para este microorganismo pueden permanecer negativos incluso varios años después de completado el tratamiento antimicrobiano (Rosenfeld, y cols., 2003).

Dependiendo de la situación clínica del paciente se diferencian dos situaciones (Wiesemann, y cols., 1998). En los pacientes en fase estable con poca clínica respiratoria, para la erradicación de la colonización inicial, se aconseja iniciar el tratamiento con un antibiótico inhalado durante un mes con colistimetato de sodio ,o 28 días con tobramicina para inhalación, o aztreonam lisina para inhalación, en asociación o no con ciprofloxacino oral durante 2-3 semanas (Cantón, y cols., 2015).

Aunque la mayoría de las primoinfecciones son asintomáticas, si el paciente presenta exacerbación leve debe iniciarse tratamiento con ciprofloxacino oral durante 2-3 semanas y en las exacerbaciones graves se recomienda iniciar un ciclo por vía intravenosa a dosis altas durante

durante 2-3 semanas, con un betalactámico (ceftazidima o cefepime) y un aminoglucósido (tobramicina o amikacina) (Cantón, y cols., 2015). Esta combinación mejora la función pulmonar e induce un menor desarrollo de resistencia en comparación con monoterapia o con otras combinaciones.

En el documento de revisión de la Cocharne del 2009 (Langton & Smyth, 2009) se concluye que:

El tratamiento con antibióticos nebulizados (solos o en combinación con antibióticos orales) es mejor opción que no tratar en la primocolonización por *P. aeruginosa*.

- No hay evidencia suficiente para determinar si las estrategias de erradicación precoz disminuyen la morbilidad, incrementan la calidad de vida o se asocian con mayores efectos adversos que el tratamiento estándar.
- No hay evidencia suficiente para determinar cuál es la mejor estrategia de erradicación.
- Los datos de varios estudios sugieren que la oportunidad de erradicar *P. aeruginosa* del tracto respiratorio FQ puede estar alrededor de 12 semanas desde la detección inicial (Hansen, y cols., 2008) (Treggiari, y cols., 2007). Los antibióticos administrados por vía intravenosa, inhalada u oral son efectivos en la erradicación precoz y no en una colonización ya establecida.

Las explicaciones propuestas para la disminución de la respuesta de los antibióticos incluyen:

- Un aumento gradual en la densidad de *P. aeruginosa* en el tracto respiratorio.
- La transición del crecimiento planctónico de las bacterias en la primocolonización al crecimiento en biopelículas en las fases posteriores.
- La aparición de otras adaptaciones fenotípicas que pueden disminuir la respuesta a los antibióticos.

5.2. Tratamiento en la fase de colonización crónica

Una vez instaurada la colonización pulmonar crónica por *P. aeruginosa* resulta imposible, al menos con la perspectiva actual, su erradicación completa, y el objetivo es minimizar el efecto deletéreo a medio o largo plazo. El daño pulmonar progresivo producido por la inflamación continua, incluso en ausencia de exacerbaciones, determina la necesidad de establecer tratamientos de mantenimiento destinados a reducir de forma sostenida la carga bacteriana y, por tanto, la consecuente respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que el tratamiento crónico (incluso en ausencia de exacerbaciones) no sólo evita el deterioro de la función pulmonar sino que también puede favorecer su recuperación (Höiby, 2000).

Se dispone de varias opciones en el tratamiento de la colonización crónica, como el empleo de terapia inhalatoria antimicrobiana diaria, que dura tanto como persista la colonización bacteriana con colistimetato de sodio o intermitente (periodos de 28 días) con tobramicina para inhalación o aztreonam lisina para inhalación (Cantón, y cols., 2015).

5.3. Tratamiento modulador

Los macrólidos pueden inhibir la producción de varios factores de virulencia de *P. aeruginosa* por diversos mecanismos, impiden la formación del biopelículas, y tienen efecto antiinflamatorio. En estudios *in vitro* actúan en múltiples niveles de la respuesta inflamatoria, pero en la mayoría de las publicaciones sus efectos solo se han demostrado en los neutrófilos y en la producción de citoquinas inflamatorias. Por otra parte, según un estudio de Saiman y cols. (Saiman, y cols., 2002) los macrólidos pueden tener acción sinérgica *in vitro* frente a *P. aeruginosa* en combinación con otros antimicrobianos.

La evidencia disponible apunta a que el tratamiento de 3 a 6 meses de duración con azitromicina es seguro, bien tolerado y produce una mejoría clínica significativa, al reducir las exacerbaciones pulmonares y mejorar la función pulmonar, por lo que en los últimos años se ha considerado una buena opción terapéutica en los pacientes con FQ y se está utilizando añadido a su tratamiento habitual (Saiman, y cols., 2005).

5.4. Nuevas estrategias para racionalizar la terapia antimicrobiana

El aumento de conocimiento de la microbiología de la FQ ofrece nuevas oportunidades para diseñar y probar racionalmente nuevas estrategias de tratamiento. Actualmente podemos disponer de los datos de un cultivo cuantitativo que nos permite los identificar cambios en la carga bacteriana. Se ha comprobado la reducción de la densidad de *P. aeruginosa* en las muestras de esputo de algunos de los pacientes FQ como resultado de terapia antibiótica IV empleando qPCR en combinación con un pretratamiento con PMA (PMA= propidium monoazide photo-crosslinking) para excluir las bacterias no viables (Rogers, y cols., 2010).

Respecto a identificar cambios en el comportamiento patogénico, hay que tener en cuenta que los tratamientos pueden modificar la virulencia provocando cambios en expresión de genes y proteínas asociados a patogenicidad. Por tanto, los análisis proteómicos y meta-transcriptómicos serían de gran utilidad. Mediante la proteómica se podrían identificar genes o moléculas cuya regulación se correlacione con síntomas clínicos (biomarcadores) que pudieran en un futuro cuantificarse de rutina, por ejemplo con inmunoensayos. En los análisis meta-transcriptómicos al ser el ARNm más lábil sería más útil para caracterizar cambios rápidos. En resumen, nuevos biomarcadores (proteicos o ARNm) pueden ser útiles para predecir exacerbaciones y/o proporcionar indicaciones para el tratamiento (Rogers, y cols., 2011).

Desde una perspectiva más integral, existen nuevas terapias dirigidas a mejorar la funcionalidad de la proteína CFTR (Ramsey, y cols., 2011), como las terapias diseñadas para corregir la función de la proteína CFTR defectuosa, como por ejemplo el empleo de Ivacaftor (Sermet-Gaudelus, 2013). En un futuro podrían cambiar el paradigma de la utilización de los antimicrobianos en la infección bronquial por *P. aeruginosa* en FQ (Bernarde, y cols., 2015).

6. Epidemiología molecular de *P. aeruginosa*

Los fundamentos de las técnicas moleculares aplicados al estudio epidemiológico en microbiología que analizan propiedades en los microorganismos son variados (Coll, y cols., 2005).

6.1. Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

El análisis del patrón de restricción del ADN mediante PFGE es un método muy discriminativo, que detecta las pequeñas variaciones que se acumulan rápidamente en el genoma bacteriano (Tenover, y cols., 1995). Puede utilizarse para investigar si la infección recurrente en un paciente es una recidiva por fracaso terapéutico o se trata de una reinfección por una cepa diferente, o si varios casos de infección en un hospital o una comunidad representan un brote o son procesos independientes producidos por distintas cepas. El uso de enzimas cuyo lugar de restricción, por su longitud y secuencia, se encuentran raramente a lo largo del ADN cromosómico de la especie bacteriana permite la macrorrestricción del ADN de la bacteria y la división del ADN en pocos fragmentos. Estos fragmentos de restricción aparecen separados en un patrón de bandas en un gel de agarosa gracias a un sistema que cambia la dirección de la corriente de acuerdo a un programa establecido. Los patrones de restricción de ADN de los distintos aislados pueden ser comparados para determinar su relación genética (Coll, y cols., 2005). El principal inconveniente de esta técnica estriba en la dificultad que a veces existe a la hora de comparar los patrones de bandas obtenidos en distintos laboratorios a pesar de la estandarización en los reactivos y en las condiciones de la electroforesis (Vílchez & Alonso, 2009).

6.2. MultiLocus Sequence Typing (MLST)

La técnica de MLST consiste en la secuenciación de fragmentos internos (de ≈ 500 pb) de siete genes altamente conservados denominados “housekeeping”. Las secuencias de estos genes se comparan con alelos ya conocidos en cada locus a través de la página web del PubMLST (<http://pubmlst.org>) en donde cada aislado es descrito mediante un perfil alélico de siete genes que definen una secuencia tipo (ST). En el

caso concreto de *P. aeruginosa*, la técnica de MLST fue desarrollada por Curran y cols. usando fragmentos internos de los siguientes genes: *acsA* (Acetyl coenzyme A synthetase), *aroE* (Shikimate dehydrogenase), *guaA* (GMP synthase), *mutL* (ADN mismatch repair protein), *nuoD* (NADH dehydrogenase I chain C, D), *ppsA* (Phosphoenolpyruvate synthase) y *trpE* (Anthralite synthetase component I) (Curran, y cols., 2004). Es útil para establecer la dispersión geográfica y temporal de las líneas clonales e identificar las variantes que van surgiendo en este proceso. Esta técnica permite la sistematización y el fácil intercambio de información entre laboratorios. La mayor desventaja es que se trata de una técnica de coste elevado, debido a la secuenciación.

6.3. Rep-PCR

En la técnica de tipificado basado en rep-PCR se realiza una amplificación múltiple utilizando como cebadores secuencias repetidas encontradas a lo largo del genoma. Cuando dos secuencias *rep* están situadas lo suficientemente cerca, el fragmento de ADN que hay entre ambas es amplificado. Dado que el número y localización de estas secuencias repetidas entre cepas es variable, el número y tamaño de los fragmentos de ADN generados también variará. Esta técnica es más sencilla y rápida que otras que probablemente poseen un mayor poder de discriminación. El principal inconveniente de esta técnica es la falta de reproducibilidad que puede presentar. Puede ser debida a la presencia de bandas de ADN de baja densidad ocasionada por diferencias en la relación de la concentración del ADN molde y del cebador. Algunos estudios demuestran que la reproducibilidad puede incrementarse utilizando concentraciones definidas de ADN purificado (Coll, y cols., 2005).

Una técnica comercial que se basa en rep-PCR es DiversiLab, comercializada por bioMérieux (Marcy l'Etoile, Francia). Se ha utilizado para establecer la clonalidad en aislados de *P. aeruginosa* pertenecientes a varias situaciones epidemiológicas (Doléans-Jordheim, y cols., 2009), e incluso para verificar la permanencia de un clon multirresistente (Ratkai, y cols., 2010). No hay mucha experiencia en la interpretación de los resultados, por lo que se recomienda comparar el empleo de esta técnica con otras de referencia como PFGE o MLST.

6.4. Espectrometría de masas MALDI-TOF

Basadas en la espectrometría de masas MALDI-TOF se han desarrollado varios sistemas que son capaces de realizar la identificación de un gran número de bacterias y hongos mediante la comparación de su huella espectral (obtenida de colonia o de extracto) con una base de datos de referencia previamente establecida. Destaca esta técnica por su reproducibilidad, ya que no presenta diferencias en el espectro obtenido bajo distintas condiciones de cultivo, al asumir que el 80-90% de las señales del espectro de la bacteria son proteínas ribosomales L (conservadas y abundantes).

Se ha empleado para diferenciar a nivel de subespecie algunas bacterias Gram negativas y Gram positivas (Dieckmann & Malorny, 2011) (Barbuddhe, y cols., 2008) (Wolters, y cols., 2011)), para realizar la diferenciación clonal de *E. coli* (Novais, y cols., 2014) y recientemente para identificar clones de alto-riesgo de *P. aeruginosa* (ST111, ST175, ST235, ST253, ST395) (Cabrolier, y cols., 2015). La discriminación de MALDI-TOF se basa en la clusterización de los espectros de proteínas que permite diferenciar taxonómicamente (Welker, 2011).

7. Crecimiento de *P. aeruginosa* en biopelículas

7.1. Definición de biopelículas o biofilms

La formación de biopelículas bacterianas ha sido ampliamente estudiada durante la última década, y actualmente se reconoce que el crecimiento en superficies es habitualmente en esta forma. En el caso de *P. aeruginosa* esta forma de crecimiento tiene un interés especial debido a que además de ser un patógeno habitual en humanos, también se caracteriza por ser un organismo con una capacidad muy versátil para persistir y proliferar en muchos ambientes distintos (Lee, y cols., 2005).

Para Donlan (Donlan & Costerton, 2002) una definición de biopelículas debe tomar en consideración no solamente las características fácilmente observables, por ejemplo, las células irreversiblemente unidas a una superficie, encajadas en una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, sino también otras cualidades fisiológicas de estos organismos, incluyendo características tales como que exhiben un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y a la transcripción de genes respecto a los organismos planctónicos.

La composición de las biopelículas es variable en función del sistema en estudio, en general, el componente mayoritario es el agua, que puede representar hasta un 97% del contenido total. Además de agua y de las células bacterianas, la matriz es un complejo formado principalmente por exopolisacáridos (Sutherland, 2001). En menor cantidad se encuentran otras macromoléculas como proteínas, ADN y productos diversos procedentes de la lisis de las bacterias (Branda, y cols., 2005).

Estudios realizados utilizando microscopía confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de las biopelículas no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas. La existencia de estos canales no evita sin embargo, que dentro podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente. Esta circunstancia aumenta la heterogeneidad sobre el estado fisiológico en el

que se encuentra la bacteria dentro de la biopelícula y dificulta su estudio (Davey & O'Toole, 2000) (Stoodley, y cols., 2002).

7.2. Biopelículas y colonización/infección

En la actualidad se reconoce que la formación de las biopelículas es un aspecto importante de muchos, si no la mayoría de las enfermedades bacterianas, incluyendo endocarditis de válvula nativa, osteomielitis, caries dental, infecciones del oído medio, infecciones de prótesis, infecciones de implantes oculares, e infecciones crónicas del pulmón en los pacientes con fibrosis quística (Donlan & Costerton, 2002). Estas infecciones presentan algunas características comunes (Stoodley, y cols., 2002) como la existencia de un tejido dañado, inóculos bacterianos pequeños inicialmente, presenta resistencia al sistema inmunitario y a la entrada de los antibióticos.

Se ha sugerido que la proteína CFTR normal podría servir como receptor para *P. aeruginosa* en el proceso de internalización, fagocitosis y eliminación en el epitelio de la vía aérea (Lyczak, y cols., 2002). En la FQ, estaría disminuida la unión de estos patógenos al CFTR con mutaciones como la F508del, lo que permitiría la libre multiplicación de *P. aeruginosa* en la mucosa respiratoria (Ratjen & Doring, 2003). Es poco probable que la fagocitosis de las células epiteliales juegue un papel importante en el establecimiento de la infección, ya que tanto *S. aureus* como *P. aeruginosa* se observan al principio en el moco endobronquial y no adheridas al epitelio.

Más recientemente se han identificado receptores TLR eucariotas específico situados en la superficie de las células epiteliales. La unión de *P. aeruginosa* a estos receptores determina la producción de interleuquinas inflamatorias, fundamentalmente IL-8 (Buchanan, y cols., 2009). Hasta la fecha se han identificado doce TLR diferentes, cada uno de ellos relacionado con la respuesta inmune innata a componentes bacterianos diferentes (Creagh & O'Neill, 2006). TLR1, TLR2 y TLR6 se han asociado con componentes de pared de microorganismos Gram positivos (lipoproteínas, peptidoglicano y ácido lipoteicoico) mientras que TLR4 y TLR5 responden a epítopos de los microorganismos Gram negativos

(lipopolisacáridos y flagelina). Como se ha indicado anteriormente, la activación de los TLR se caracteriza por la activación de NF- κ B y de mediadores proinflamatorios (IL-8, IL-6) y TNF- α (Buchanan, y cols., 2009).

Por otra parte, en los pacientes con FQ existe una reducción de la expresión de los receptores de membrana relacionados con las inmunoglobulinas denominados TREM-1 (triggering-receptor expressed on myeloid cells) en los monocitos y los neutrófilos que se produce tras el reconocimiento bacteriano y que favorecerían la persistencia bacteria (del Fresno, y cols., 2008).

7.3. Etapas en el proceso de formación del biopelículas

La etapa inicial del proceso de formación del biopelículas es la adherencia sobre la superficie, como hemos comentado anteriormente. En bacterias Gram negativas se ha visto que los flagelos, las fimbrias de tipo I, IV y los curli son importantes para la etapa de adherencia primaria (O'Toole, y cols., 2000). La motilidad parece que ayuda a la bacteria a alcanzar la superficie y contrarrestar las repulsiones hidrofóbicas. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia similar a como ocurre durante el proceso de formación de colonias en placas de agar (Figura 9. Representación esquemática del crecimiento en forma de biopelícula.)

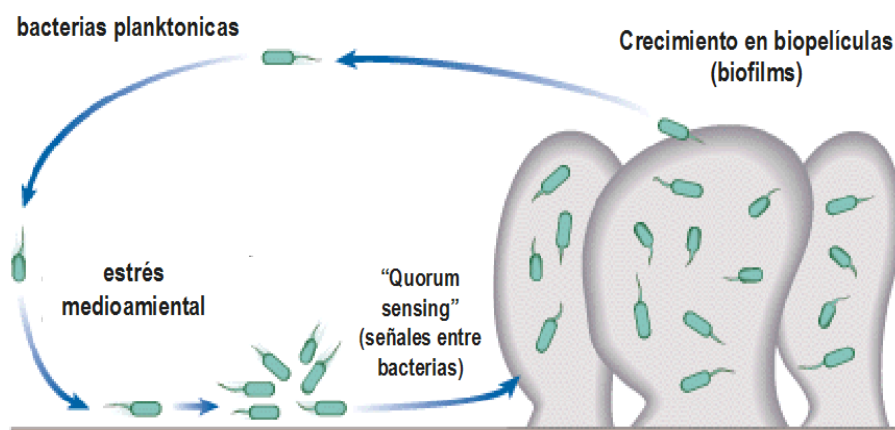


Figura 9. Representación esquemática del crecimiento en forma de biopelícula.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biopelículas y forma unas estructuras similares a setas entre las cuales se observa la presencia de canales (Donlan & Costerton, 2002). La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *Salmonella typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *Vibrio cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc. Además, estudios recientes han puesto de manifiesto que incluso una misma bacteria, dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre, puede producir distintos exopolisacáridos como componentes de la matriz del biopelículas.

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biopelículas se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies cerrando el proceso de desarrollo de formación del biopelículas. La liberación de las bacterias desde el biopelículas es el proceso que menos se conoce. Se ha sugerido que la degradación controlada del exopolisacárido puede representar un mecanismo controlado de liberación de bacterias (Kaplan, y cols., 2004).

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biopelículas está regulado por una compleja cascada de reguladores. Un trabajo pionero con *P. aeruginosa* demostró que el

proceso de formación del biopelículas está regulado por un proceso de *quorum sensing* o autoinducción. El sistema de *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria sentir la densidad de población existente. Cuando en el medio extracelular se acumula una suficiente cantidad del autoinductor, éste activa un receptor específico que altera la expresión de genes afectando a distintos fenotipos. Además de la regulación a nivel transcripcional, existen numerosos indicios de la existencia de una regulación postranscripcional del proceso de formación del biopelículas (Lasa, y cols., 2005).

7.4. Resistencia de biopelículas a los antimicrobianos

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas de las infecciones agudas es su mala respuesta a los tratamientos antibióticos. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas tras un breve tratamiento antibiótico, las infecciones por biopelículas normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, y producen episodios recurrentes. Esto se debe a que las bacterias pueden ser hasta 1.000 veces más resistentes a los antibióticos que esas mismas bacterias crecidas en medio líquido (Mah & O'Toole, 2001; Stewart & Costerton, 2001).

Una cuestión planteada por numerosos investigadores es porqué las infecciones con *P. aeruginosa* mucosa son tan recalcitrantes y resistentes a acción del sistema inmune. El modo de crecimiento en biopelículas protege a los organismos contra agentes antimicrobianos y defensas del organismo, limitando su difusión a través de la matriz extracelular. La capa de alginato de las cepas mucosas parece prevenir contra los anticuerpos y bloquea los determinantes inmunológicos requeridos para la fagocitosis opsónica. Las cepas mucosas son más resistentes a la fagocitosis no opsónica que las cepas no mucosas (May, y cols., 1991). Hay evidencia de que el alginato puede promover la adherencia de las cepas mucosas a las células epiteliales en la zona pulmonar, de tal modo que inhiben la separación. Los experimentos *in vivo* con ratas infectadas confirmaron este hecho; las cepas mucosas de *P. aeruginosa* fueron

“aclaramas” menos rápidamente de la zona pulmonar que las cepas no mucosas (May, y cols., 1991). Anwar y cols. (Anwar, Strap, & Costerton, Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum, 1992) han sugerido también que la edad del biopelículas era un factor crítico en la supervivencia de *P. aeruginosa*. En su sistema experimental, las células más viejas del biopelículas de este organismo eran menos sensibles a la sangre entera o al suero que biopelículas más jóvenes o los organismos planctónicos.

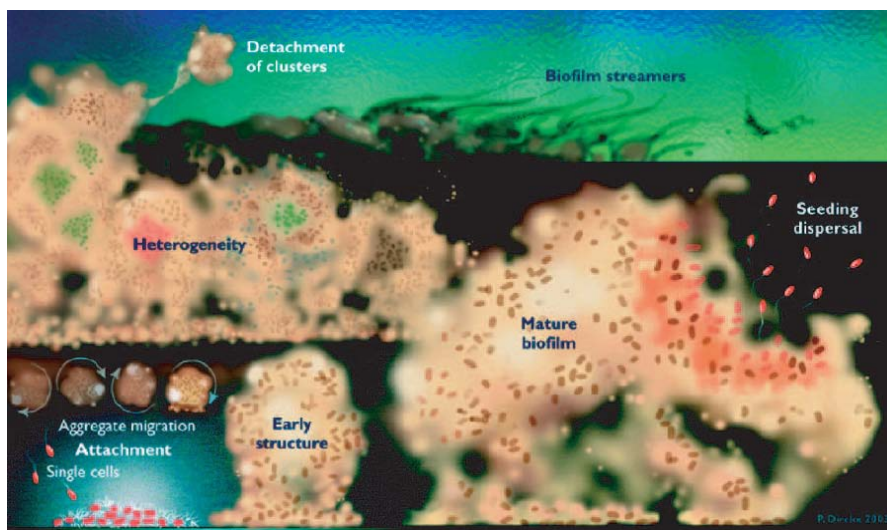


Figura 10. Estructura de las biopelículas.

(Fux y cols., 2003).

La naturaleza de la estructura de las biopelículas (Figura 10) (Fux, y cols., 2003) y las cualidades fisiológicas de los organismos de la biopelícula confieren una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos, ya sean antibióticos, desinfectantes, o germicidas. Las bases de la resistencia bacteriana en biopelículas se están aún investigando, pero entre las razones más barajadas se incluyen:

1. La barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos de la biopelícula.

2. El crecimiento ralentizado de las bacterias de la biopelícula debido a la limitación de nutrientes.

3. La activación de respuestas de estrés que provocan cambios en la fisiología de la bacteria y la aparición de un fenotipo específico de la biopelícula que activamente combata los efectos negativos de las sustancias antimicrobianas (Mah & O'Toole, 2001).

Entre todas estas posibles razones, la explicación más intuitiva para la escasa eficacia de los antibióticos contra las bacterias en biopelículas es la incapacidad del antibiótico para penetrar en las biopelículas a través de la matriz exopolisacáridica. Se puede entender teniendo en cuenta que el agente antimicrobiano debe difundir a través de la matriz de la biopelícula para inactivar los microorganismos. Las sustancias poliméricas extracelulares que constituyen esta matriz presentan una barrera difusional para estas moléculas influenciando el índice del transporte de la molécula al interior o la reacción del material antimicrobiano con el material de la matriz. Suci y cols. (Suci, y cols., 1994) demostraron una penetración retrasada de ciprofloxacino en biopelículas de *P. aeruginosa*; que requiriendo normalmente 40 segundos para una superficie estéril requirieron 21 minutos para una superficie que contenía biopelículas. Hoyle y cols. (Hoyle, y cols., 1992) encontraron que las células bacterianas dispersadas eran 15 veces más sensibles a la tobramicina que las células en biopelículas intactos. Hatch y Schiller (Hatch & Schiller, 1998) demostraron que una suspensión del 2% de alginato aislado de *P. aeruginosa* inhibía la difusión de gentamicina y de tobramicina, y este efecto fue invertido usando alginato liasa. Por tanto, diferentes estudios en los que se ha medido la penetración de los antibióticos en las biopelículas de *P. aeruginosa* han mostrado que la matriz altera la velocidad de penetración de los antibióticos (las fluoroquinolonas penetran rápidamente y los aminoglucósidos más lentamente), pero en principio todos los antibióticos ensayados son capaces de penetrar hasta el interior en unas horas y alcanzar concentraciones bactericidas para las formas planctónicas.

Respecto a la alteración de la tasa de crecimiento de los organismos de las biopelículas, se cree que las células asociadas crecen considerablemente más lentamente que las células planctónicas y,

consecuentemente adquieren agentes antimicrobianos más lentamente. Anwar y cols. (Anwar, y cols., 1992) han descrito que las células más antiguas (10 días) crecidas en biopelículas eran considerablemente más resistente a la tobramicina y a la piperacilina que aquellas más jóvenes (2 días).

Para entender que otros cambios fisiológicos confieren resistencia debido al modo de crecimiento en biopelículas considerar que las bacterias Gram negativas responden a la limitación de nutrientes y a otras cepas ambientales. La limitación de nutrientes y el aumento de concentraciones de metabolitos tóxicos pueden ser particularmente agudos dentro de las profundidades de las biopelículas establecidas. Tresse y cols. encontraron que las células de *E. coli* encerradas en agar eran más resistentes a un aminoglucósido según iba disminuyendo el oxígeno que llegaba a las cepas (Tresse y cols., 1995).

Por otra parte, en los pacientes con FQ existe una reducción de la expresión de los receptores de membrana relacionados con las inmunoglobulinas denominados TREM-1 (triggering-receptor expressed on myeloid cells) en los monocitos y los neutrófilos que se produce tras el reconocimiento bacteriano y que favorecerían la persistencia bacteria (del Fresno y cols., 2008).

7.5. Estudio de sensibilidad de *P. aeruginosa*. Crecimiento en biopelículas

Los métodos recomendados para el estudio de sensibilidad son aquellos que permiten el cálculo de la concentración mínima de antimicrobiano que es capaz de inhibir el crecimiento bacteriano (concentración mínima inhibitoria, CMI), entre ellos la microdilución (preferentemente utilizada en los sistemas automáticos) y la dilución en agar.

Se discute la utilidad de los métodos de rutina tradicionales utilizados en los laboratorios de microbiología en FQ, ya que siempre se trabaja con bacterias planctónicas y no con las que están en crecimiento en biopelículas o biofilms (Chernish & Aaron, 2003) (Miller & Gilligan, 2003). Se ha constatado la mayor resistencia de *P. aeruginosa* a los

antimicrobianos cuando ésta se desarrolla en biopelículas (Moskowitz, y cols., 2004) (Aaron, y cols., 2002) y se especula con la necesidad de hacer crecer *P. aeruginosa* en anaerobiosis o con baja tensión de oxígeno, mimetizando las condiciones de su crecimiento en el pulmón del paciente con FQ (Miller & Gilligan, 2003) (Worlitzsch, y cols., 2002).

Un problema adicional de la práctica clínica relacionado con la resistencia de las biopelículas a los antimicrobianos es la ausencia de métodos estandarizados de uso rutinario para determinar la sensibilidad de las bacterias de una biopelícula a los antimicrobianos. Se han realizado intentos por adaptar métodos desarrollados en laboratorios de investigación, pero todavía no se ha adoptado ningún protocolo estándar para este fin. Entre estos métodos, destacan por su facilidad para adaptarse al diagnóstico clínico el método descrito por Amorena y cols. (Amorena, y cols., 1999) y el método denominado “Calgary Biofilm Device” (Ceri, y cols., 1999).

En el primer método, la biopelícula desarrollado sobre pocillos de placas de microtiter durante distintos períodos de tiempo, se expone a los tratamientos antimicrobianos, el número de bacterias viables que han resistido el tratamiento se cuantifica midiendo la cantidad de ATP por bioluminiscencia. El método “Calgary Biofilm Device” utiliza una placa tipo microtiter con una tapa especial. Esta tapa tiene 96 púas o pinchos que se introducen y ajustan perfectamente en cada uno de los pocillos de las placas microtiter. Las biopelículas formadas sobre las púas de la tapa se pueden llevar a otra placa para su exposición a la acción de las distintas concentraciones de antibióticos. Finalmente, el número de bacterias supervivientes se cuantifican realizando recuentos en medios de cultivo.

Basado en este método, se ha propuesto un método de estudio de sensibilidad con crecimiento en biopelículas que puede aproximar la situación real en la que se encuentra los antimicrobianos en contacto con *P. aeruginosa* (Moskowitz, y cols., 2004).

También se ha constatado con técnicas de microscopía confocal y colorantes vitales que no todos los antimicrobianos son activos de igual forma sobre las bacterias en crecimiento en biopelículas.

La tobramicina y la ciprofloxacina actúan sobre las células metabólicamente más activas que se sitúan sobre la superficie de la biopelícula y que son responsables de la diseminación a nuevos lugares de colonización. Por el contrario, la colistina ejerce más su acción sobre células metabólicamente mas inactivas, que están en la parte central de la biopelículas y que son responsables de la persistencia de la biopelícula (Høiby, y cols., 2010) (Figura 11). Es importante el conocimiento de estas diferencias para establecer el tipo de tratamiento antimicrobiano y las posibles asociaciones que puedan beneficiar a los pacientes con FQ.

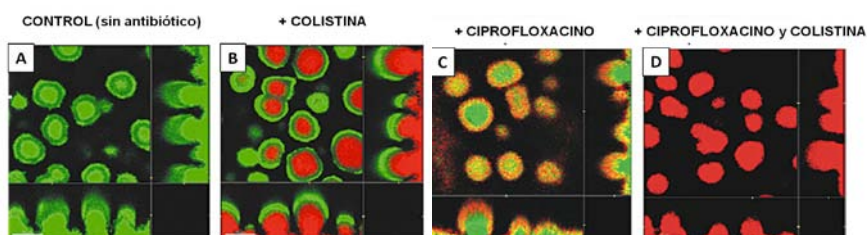


Figura 11. Fotografía tomada por microscopía confocal de un crecimiento en biopelícula en ausencia o presencia de antimicrobianos.

Las células de color verde están vivas mientras que las de color rojo estarían muertas.
(Høiby y cols., 2010).



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que colonizan el pulmón de los de pacientes con fibrosis quística (FQ) presentan particularidades que las diferencian del resto de cepas aisladas en otras localizaciones y compartimentos. Se ha sugerido que las cepas causantes de la primocolonización son muy similares a las cepas ambientales, aunque no existen suficientes estudios científicos que hayan abordado este tema.

Las particularidades y el origen de la colonización pulmonar en el paciente de FQ sigue siendo un tema de actualidad, y aunque muchos grupos sospechan la transmisión de paciente a paciente, lo cierto es que todavía esta teoría no está totalmente demostrada.

La **Hipótesis** de partida de esta tesis doctoral fue que existe una adaptación evolutiva durante el proceso de colonización pulmonar crónica por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ. Este proceso justificaría las diferencias entre los aislados no mucosos, con alta sensibilidad a los antibióticos y normomutadores que causan la primocolonización frente a las cepas mucosas, resistentes a los antibióticos e hipermutadoras que se aíslan durante la colonización crónica, tanto en crecimiento planctónico como en biopelículas.

Existen escasos datos sobre la epidemiología molecular de estas cepas y la aplicación de técnicas de epidemiología molecular podría documentar el inicio de una colonización, colonizaciones cruzadas entre pacientes o identificar la presencia de clones hipertransmisibles. También puede ser de utilidad para la interpretación de los datos clínicos de los pacientes en el seguimiento de las fases de colonización y en el potencial efecto erradicador del tratamiento antimicrobiano ya que en los pacientes con varios aislados de la categoría de primocolonización pueden revelar falsas erradicaciones o nuevas colonizaciones.

Con todo ello, los **Objetivos** que nos planteamos fueron:

1. Determinar la prevalencia de *P. aeruginosa*, su patrón de colonización en los pacientes atendidos en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal entre los años 1993 y 2011, así como el análisis de la evolución de la colonización broncopulmonar por *P. aeruginosa* en diferentes periodos (1993-1995, 2002-2003, 2006-2007, 2010-2011) teniendo en cuenta el impacto de las medidas implantadas a lo largo de estos años (vacunación frente a *P. aeruginosa*, utilización de azitromicina, inhalación de suero salino hipertónico y cribado neonatal) y de la incorporación de nuevas técnicas de identificación bacteriana (espectrometría de masas MALDI-TOF).
2. Describir las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con FQ con primocolonización broncopulmonar por *P. aeruginosa* en nuestro hospital (1994-2009) y comprobar si la adquisición de *P. aeruginosa* tiene algún factor de riesgo específico.
3. Establecer la capacidad de crecimiento en biopelículas de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de pacientes con FQ en fase de primocolonización, comparando la sensibilidad antibiótica en biopelículas con su crecimiento planctónico y la posible presencia de cepas hipermutadoras.
4. Desarrollar un método para analizar la capacidad de prevención de diferentes antimicrobianos de la formación de biopelículas y definición de un nuevo parámetro BPC (concentración que previene la formación de biopelículas) con potencial utilidad en la elección de los antimicrobianos en el paciente con FQ.
5. Conocer la estructura poblacional de los aislados de primocolonización y analizar su relación genética mediante las técnicas de PFGE, MLST y rep-PCR DiversiLab®.

6. Adaptar las nuevas de técnicas de espectrometría de masas para el análisis de la clonalidad y de la evolución de los aislados *P. aeruginosa* dentro de un mismo paciente y también entre varios pacientes así como afianzar y evaluar esta metodología para la detección e identificación rápida de los microorganismos en FQ.
7. Evaluar si las técnicas de Microbiología Molecular pueden mejorar la detección de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias de pacientes FQ sin colonización broncopulmonar previa.



MATERIAL Y MÉTODOS

1. Colonización broncopulmonar en pacientes de la Unidad de FQ

Con el objetivo de conocer la evolución en la epidemiología de la colonización broncopulmonar por *P. aeruginosa* en los pacientes con FQ de la Unidad de FQ de nuestro Hospital Universitario Ramón y Cajal se realizó un análisis retrospectivo entre los años 1993-2011 de los resultados de los cultivos de muestras respiratorias de estos pacientes. Todos los datos fueron obtenidos del Sistema Informático del Laboratorio del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Ramón y Cajal. Este análisis se ha dividido en cuatro periodos de tiempo separados:

Periodo A: 1993-1995(n=81 pacientes)

Periodo B: 2002-2003 (n=127 pacientes)

Periodo C: 2006-2007 (n=183 pacientes)

Periodo D: 2010-2011 (n=197 pacientes)

Los periodos A y B fueron analizados previamente en la Tesis Doctoral de María García Castillo y en esta Tesis se completaron con el periodo C, posterior a la utilización de una vacuna frente a *P. aeruginosa*, y el periodo D en el que se implantó la administración de azitromicina, el suero salino hipertónico inhalado y el cribado neonatal.

En el análisis de los resultados correspondientes a cada paciente se incluyen las diferentes muestras respiratorias: esputos (muestra mayoritaria), esputo inducido, broncoaspirados (BAS), lavados broncoalveolares (BAL) y aspirado nasofaríngeo (en niños muy pequeños). Se incluyen los aislados de *P. aeruginosa*, así como la co-colonización/ co-infección con otros microorganismos.

2. Selección de pacientes con primocolonización

Se identificaron a todos los pacientes atendidos en la Unidad de Fibrosis Quística del Hospital Universitario Ramón y Cajal entre Enero de 1994 y Diciembre de 2009 en los que se podía datar eventos de primocolonización, correspondiéndose con un total de 25 pacientes. Se procedió a la recogida de datos epidemiológicos y clínicos de cada uno de ellos a partir de su historia clínica, registrándose en una base de datos confeccionada para tal fin, basada en el formato del Registro europeo de pacientes con FQ (<https://www.ecfs.eu/projects/ecfs-patient-registry/Variables-Definitions>) (<http://www.sefq.es/REFQ/Registro FQ-10.pdf>). Se hizo especial hincapié en obtener información acerca del momento de aparición del primer aislamiento de *P. aeruginosa*: existencia de co-infección/co-colonización con otros microorganismos, recuento microbiológico, etc.,.... Todos los datos se analizaron estadísticamente con un análisis de regresión lineal mediante el software informático SPSS (Statistical Product and Service Solutions).

3. Cepas clínicas de *P. aeruginosa*

Una vez identificados los 25 pacientes de primocolonización, se estudiaron los 196 aislados disponibles de un total de 209 *P. aeruginosa* (rango 1-3 por muestra) procedentes de los pacientes seleccionados (de 1 a 51 aislados por paciente) de primocolonización y en el seguimiento posterior, desde 1994 a 2009. Los aislados obtenidos entre el año 1994 y el 2005 se recuperaron del cepario del Servicio de Microbiología, en donde estaban archivadas a -70°C , y los aislados más recientes (a partir del 2005) se recogieron de forma prospectiva.

3.1 Procedimiento de siembra e identificación

El cultivo microbiológico de las secreciones respiratorias de los pacientes con FQ debe incluir medios generales y selectivos-diferenciales para los patógenos habituales y una incubación más prolongada que la que se realiza con las muestras de otros pacientes (Wong, y cols., 1984). La inclusión de estos medios facilita la recuperación de patógenos que se encuentren en baja proporción, sobre todo en los casos en los que exista una colonización simultánea con *P. aeruginosa* que puede ocultar su crecimiento. Se debe procesar la muestra en una cabina de seguridad biológica. La siembra cuantitativa para recuento bacteriano de las muestras respiratorias se realizó de la siguiente forma:

Homogenización y fluidificación de la muestra respiratoria: La muestra se mezcló, por medio de agitación con vortex, con un volumen variable de N-acetilcisteína (Fluimucil®), que dependía de la consistencia de la muestra, hasta conseguir una suspensión uniforme. Dilución de la muestra:

Se prepararon diluciones seriadas ($1:10^{-2}$: 10^{-4}) del homogeneizado en tubos que contenían 5 ml de suero salino (SS).

Sembrar la muestra para cultivo cuantitativo: se utilizó el aparato Eddy Jet Spiral Plater (Iul Instrument, Barcelona, España), que permite una técnica de inoculación en espiral y una distribución exponencial de la muestra en estado líquido en un rango decreciente desde el centro de la placa a la periferia. Así, una vez incubada, la placa de Petri muestra en el

centro colonias más pequeñas y agrupadas, mientras que hacía la periferia, éstas son de mayor tamaño y están más separadas. La máquina cuenta con microjeringuillas que aspiran y extienden la muestra por la placa. Al ser desechables, se elimina la contaminación cruzada y la necesidad de pasos de lavado entre muestra y muestra. Los volúmenes que se siembran en cada placa son previamente fijados en el programa seleccionado en el aparato Eddy Jet.

De la suspensión inicial se sembraron 50 µl en placas de agar manitol-sal, agar MacConckey (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK), el medio selectivo para *B. cepacia* que puede ser una placa de OFPVL (Oxidación, Fermentación, Polimixina, Vancomicina, Lactosa) o de BCSA (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Francia) y 50 µl en tubos con SC (Sabouraud-cloranfenicol) y SAC (Sabouraud-cloranfenicol-actidione). De la segunda dilución (10^{-2}), se sembraron 50 µl en placas de agar manitol sal, agar MacConckey, agar chocolate con bacitracina y agar sangre Columbia 5 %. Por último, de la última dilución (10^{-4}) se sembraron 50 µl en placas con medios de agar chocolate con bacitracina y agar sangre Columbia 5%. Siempre se debe incluir un medio general (agar sangre), en el que también podemos obtener un crecimiento adecuado de *S. pneumoniae* y puede utilizarse para realizar un recuento total de la microbiota en la muestra respiratoria.

El medio de MacConckey es selectivo para cualquier bacilo Gram negativo por lo que permite el reconocimiento de las enterobacterias y de otros bacilos Gram negativos no fermentadores. El desarrollo de *P. aeruginosa* debe inspeccionarse simultáneamente en el medio de agar-sangre. Esta práctica facilita la diferenciación de los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* en que se clasifican habitualmente las colonias que crecen a partir de las secreciones de los pacientes con FQ (mucosa, puntiforme o SCV, rugosa, metálica y enterobacteriaceo).

La detección de *H. influenzae* se puede incrementar empleando en atmósfera de CO₂ agar chocolate suplementado con bacitracina y colistina, que inhiben respectivamente el crecimiento de la mayoría de la microbiota comensal no patógena de la orofaringe y de *P. aeruginosa*. El medio manitol sal es selectivo para *S. aureus* gracias a elevada concentración de sal y diferencial por su capacidad de fermentar el

manitol. Aún cuando no existan evidencias para sospechar una colonización por *B. cepacia*, se debe incluir un medio específico para este patógeno, como el medio OFPVL (Cimolai, y cols., 1995).

Las placas de agar sangre, agar MacConkey y agar manitol sal se incubaron a 35-37° C durante 48 horas, las placas de agar chocolate-bacitracina durante dos días, en atmósfera de CO₂; y los tubos de Sabouraud-cloranfenicol (SC) y Sabouraud-cloranfenicol-actidione (SAC) a 30°C y 37°C durante 4 semanas. Una vez finalizado el periodo de incubación, se observaron las colonias de cada medio de cultivo determinando el número total de unidades formadoras de colonias por ml de muestra (UFC/ml) y el específico de cada uno de los microorganismos aislados en los distintos medios de cultivo.

Todas las colonias con morfología compatible con *P. aeruginosa* fueron identificadas mediante los sistema semiautomático Pasco (Difco, Detroit, MI, USA) o Wider (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid, España), y a partir de 2009 estuvo disponible la espectrometría de masas MALDI-TOF. Los sistemas semi-automáticos también proporcionaron la sensibilidad a penicilina, amoxicilina, amoxicilina-clavulánico, piperacilina/tazobactam, cefalotina, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, imipenem, ertapenem, meropenem, kanamicina, gentamicina, tobramicina, amikacina, nitrofurantoina, ácido nalidixico, ciprofloxacino, minociclina, aztreonam, cotrimoxazol, fosfomicina y colistina. La selección de los antibióticos incluidos en los paneles, se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) y de los grupos español, MENSURA (Mesa española de Normalización de la Sensibilidad y Resistencia a los Antimicrobianos), y francés, SFM-CA (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie).

En los pacientes con FQ y con colonización-infección crónica es muy frecuente encontrar múltiples morfologías coloniales atípicas entre las que cabe destacar las colonias mucoides o mucosas y las puntiformes (Figura 12). Otras morfologías coloniales frecuentes en la FQ son los morfotipos metálico, enterobacteriaceo y el rugoso. Además, se debe buscar activamente cepas no pigmentadas y con morfologías aberrantes.



Figura 12. Morfotipos de colonias de *P. aeruginosa*

3.2 Cepas control

Para la estandarización inicial de los diferentes procedimientos o como controles se utilizaron las siguientes cepas de referencia:

- *P. aeruginosa* PAO1 (Stover y cols., 2000)
- *P. aeruginosa* PAO Δ mutS, derivada isogénica de PAO1 e hipermutadora, presenta una delección de un fragmento NotI-NotI de 1,5 Kb que ha sido reemplazado por un gen que confiere resistencia a kanamicina (KAN) (Oliver y cols., 2004).
- *P. aeruginosa* ATCC 27853
- *P. aeruginosa* ATCC 29213

4. Estudios de sensibilidad antimicrobiana

4.1 Sensibilidad planctónica

La identificación y la sensibilidad estandarizada (**CMI, concentración mínima inhibitoria**) de las 196 cepas de *P. aeruginosa* aisladas en la primocolonización y en el seguimiento posterior de los 25 pacientes elegidos, se llevaron a cabo por microdilución en caldo mediante los sistemas semiautomáticos comerciales PASCO (De 1994 a 2000) y WIDER (Soria Melguizo, Madrid, España) (De 2000 a 2009), como se explicó anteriormente. El panel comercial incluye 25 antimicrobianos, entre ellos 12 con posible actividad frente a *P. aeruginosa*.

También se estudió la **concentración mínima bactericida (CMB)** del antibiótico, sembrando 10 µl del primer pocillo donde no hay crecimiento y de los pocillos siguientes en placas de MH agar. Tras incubar durante 24 horas estos subcultivos, se definió como CMB la primera concentración en la que no se observó crecimiento de colonias viables en las placas.

4.2 Pruebas de sensibilidad en biopelícula

Para las pruebas de sensibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* con crecimiento en biopelícula se emplearon ocho antimicrobianos. El rango de concentraciones empleados fueron los siguientes: levofloxacino (0,125-64 µg/ml), ciprofloxacino (0,125-64 µg/ml), imipenem (0,25-128 µg/ml), ceftazidima (1-512 µg/ml), tobramicina (0,25-128 µg/ml), tetraciclina (2-1024µg/ml), colistina (0,25-128 µg/ml) y azitromicina (0,5-256 µg/ml). El levofloxacino se obtuvo de Sanofi-Aventis (Barcelona, España), y el resto fueron comprados a Sigma (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo). Los antibióticos se disolvieron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

El inóculo de cada cepa se realizó a partir de una colonia aislada de *P. aeruginosa* que se inoculó en una suspensión en 5 ml de medio líquido LB (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK), incubándose a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente, se preparó una dilución 1/100 con medio líquido Mueller-Hinton (MHB)(Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, UK).

Utilizamos el método descrito por Moskowitz (Moskowitz, y cols., 2004) que consiste en dispensar 50 µl de la dilución 1/100 del microorganismo a estudiar en todos los pocillos de las columnas 1 a 11 de placas de microdilución de 96 pocillos de fondo plano (Alpha Laboratorios LTD, Hampshire, UK) a los que previamente se han añadido 50 µl de MHB (Figura 13). La formación de la biopelícula tiene lugar en la correspondiente tapa de 96 pinchos o púas de poliestireno (Nunc TSP System, Roskilde, Denmark), que se sumergen en los pocillos durante la incubación en estufa a 37º durante 24h.

Las tapas de pinchos se lavan 3 veces consecutivas en placas multipocillos con 100 µl de agua destilada en todos los pocillos para eliminar las bacterias que no están formando parte de la biopelícula y se colocan en placas de microdilución con pocillo de fondo plano rotuladas para cada cepa que contienen las diluciones seriadas de los antimicrobianos hasta columna 10 además de 100 µl MHB en todas las columnas. Para cada cepa se realiza un control de crecimiento bacteriano (columna 11) y un blanco (columna 12). Se mantienen las placas tapadas en estufa a 37º durante toda la noche. Las tapas de pinchos se colocan sobre placas multipocillos con 100 µl de MHB, sin antimicrobiano, en todos los pocillos. Se centrifugan a 5.000 rpm durante 5 min para transferir la biopelícula que ha crecido adherido a los pinchos al medio de cultivo. Después de descartar las tapas de pinchos, se procede a la lectura inicial de la densidad óptica a 405 nm (DO_{405}) de las placas a las cero horas en un espectrofotómetro (Flow Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Finland). Para favorecer el crecimiento bacteriano, las placas con las tapas normales se mantienen en estufa a 37º durante 6 horas y se realiza una segunda lectura tras este período. Además, tras incubar las placas durante la noche se realiza la lectura final a las 24 horas.

Se define la **concentración mínima inhibitoria de la biopelícula (CIB)** como la concentración mínima de antimicrobiano que permite una diferencia en la DO del 10%. Este valor equivale a una diferencia de 1-log10. En la práctica correspondería a la concentración del antimicrobiano para la cual se produce una caída brusca del valor de DO con respecto al control de crecimiento bacteriano en biopelícula.

Para evaluar la **concentración mínima bactericida en biopelícula (CBB)**, 10 µl del primer pocillo en el cual no ha habido crecimiento visible, ni detectado espectrofotométricamente en el experimento del CIB, se inocularon en placas de MH. Se sembraron todas las diluciones por encima del valor de CIB, para comprobar la actividad bactericida del antibiótico frente a la biopelícula.

Mediante una modificación del método de Moskowitz descrito previamente se obtiene la **concentración mínima inhibitoria que previene la formación de biopelículas** de las cepas de *P. aeruginosa*, denominada en este trabajo como **CPB** (Fernández-Olmos, y cols., 2012).. En este nuevo procedimiento la diferencia esencial es que se induce la formación de biopelícula en placas de microdilución que contienen previamente los antimicrobianos. Más detalladamente (Figura 14), consiste en dispensar 50 µl de la dilución 1/100 de *P. aeruginosa* en todos los pocillos de las columnas 1 a 11 de placas de microdilución de 96 pocillos de fondo plano (Alpha Laboratorios LTD, Hampshire, UK) que ya contienen todas las diluciones seriadas de los ocho antimicrobianos y 50 µl de MHB. Se colocan las tapas con pinchos (Nunc TSP System, Roskilde, Denmark) en las placas para permitir la formación de la biopelícula en estufa a 37º durante toda la noche. Las tapas de pinchos se lavan 3 veces con agua destilada y se colocan en placas de microdilución de pocillo de fondo plano con 100 µl de MHB, sin antimicrobiano, en todos los pocillos. Se centrifugan a 5000rpm durante 5 min. Se realizan las lecturas de la densidad óptica a 405 nm (DO₄₀₅) de las placas en un espectrofotómetro (Flow Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, Finland), a las 0h, 6 h y 24 h.

También se ha definido en este trabajo la **concentración mínima preventiva de formación de biopelícula (CPB)** como aquella que correspondería a la concentración del antimicrobiano para la cual se produce una caída brusca del valor de DO con respecto al control de crecimiento bacteriano en biopelícula, de la misma forma que se ha descrito anteriormente para la determinación del CIB.

En todos los datos de sensibilidad bacteriana se calcularon los valores de percentil 50, percentil 90 y de media geométrica para poder comparar CPB y CIB. Para cada antimicrobiano también se calcula la relación CPB /CMI, CIB/CMI, CIB/CPB.

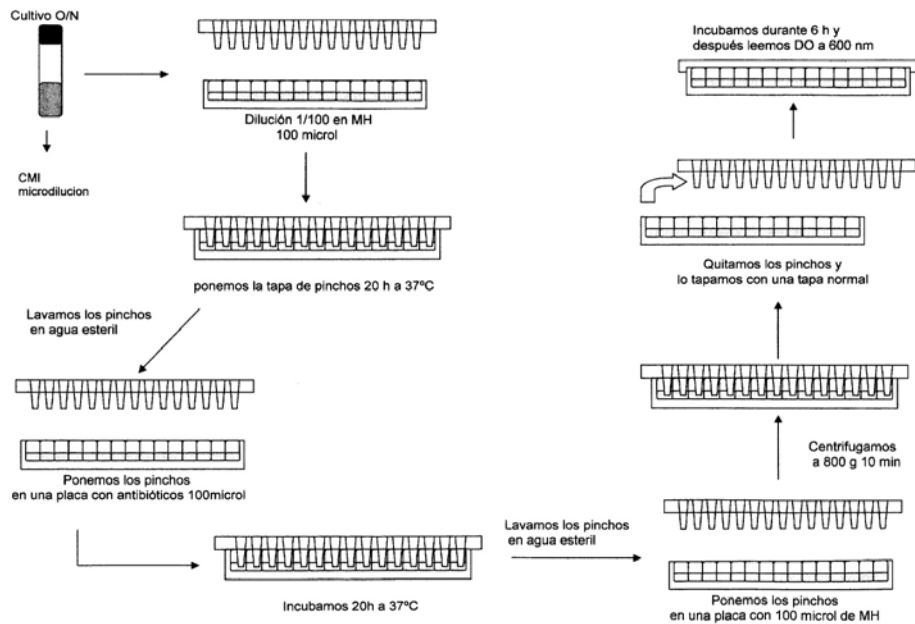


Figura 13. Esquema de trabajo para determinación de CIB

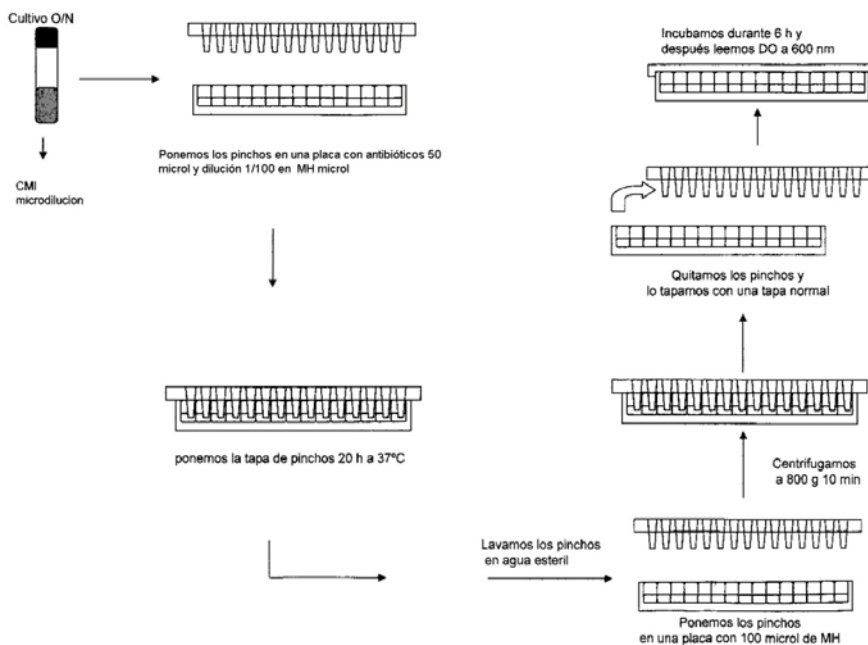


Figura 14. Esquema de trabajo para determinación de CPB

5. Determinación de la frecuencia de mutación

El cálculo de la frecuencia de mutación para rifampicina se realizó en 57 cepas de primocolonización seleccionadas que inicialmente eran sensibles a este antibiótico. A partir de una placa de LB agar (Difco, Detroit, MI, USA) con colonias aisladas, se seleccionan 3 colonias diferentes de un mismo aislado y se inoculan en 10 ml de LB broth incubándose 24 h a 37°C. Para cada tubo se calcula la concentración final de bacterias viables y posteriormente se plaquearon 500 µl en LB suplementado con 300 µl/ml de rifampicina (1 placa por colonia aislada) que se deja incubar a 37°C durante al menos 48 h. La frecuencia de mutación se definió como la proporción de colonias mutantes respecto al total de células viables. La determinación para cada cepa se realizó por triplicado, y el resultado expresa la media de los tres valores obtenidos.

Las cepas fueron clasificadas en base a su frecuencia de mutación en hipomutadoras (5×10^{-10} - 5×10^{-9}), normomutadoras ($7,5 \times 10^{-9}$ - $7,5 \times 10^{-8}$) e hipermutadoras (1×10^{-7} - 5×10^{-6}).

6. Métodos empleados en epidemiología molecular

El análisis de la clonalidad molecular de las cepas clínicas de *P. aeruginosa* se realizó mediante tres técnicas diferentes desde el punto de vista metodológico: electroforesis de campo pulsado (PFGE), MultiLocus Sequence Typing (MLST) y DiversiLab. Cada una de estas herramientas ofrece una alternativa de gran utilidad para la investigación epidemiológica. A continuación, se describen los esquemas seguidos específicamente para *P. aeruginosa*.

6.1 Electroforesis en Campo Pulsado (PFGE)

La técnica de PFGE fue desarrollada en 1984 por Schwartz y Cantor, y es una variación de la electroforesis en gel de agarosa en la cual la orientación del campo eléctrico no es unidireccional sino alternante (Coll, Coque, y cols., 2005). Este cambio periódico en la dirección de migración de las moléculas de ADN, previamente digerido con endonucleasas de baja frecuencia de corte, permite separar fragmentos de ADN de alto peso molecular, produciéndose patrones de 5 a 20 fragmentos de un tamaño de 10 a 800 Kb.

Para la macrorrestricción del ADN es necesario seleccionar un enzima de restricción para PFGE que genere pocos fragmentos de ADN y estos sean de gran tamaño, debe tenerse en cuenta que ello depende de la longitud y de la secuencia del lugar de restricción del enzima. En general, los enzimas con un lugar de restricción rico en G+C, son adecuados para tratar el ADN bacteriano de especies con genoma rico en A+T y, a la inversa, enzimas que reconocen secuencias A+T, son adecuados para digerir ADN rico en G+C. En el caso de *P. aeruginosa*, hemos utilizado la enzima *SpeI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

El sistema de electroforesis fue CHEF DR-III (Bio-Rad, La Jolla, CA, EEUU) que tiene veinticuatro electrodos en un contorno hexagonal (ángulo de 120°) (Coll, y cols., 2005). El tampón de electroforesis fue TBE (0,5X). Para la realización de esta técnica se llevaron a cabo los siguientes pasos:

Se inoculó una colonia de cada aislado en 5 ml de caldo Luria Broth (LB) (Oxoid, LTD., Basingstoke, Hampshire, R.U) y se incubó durante 16 horas a 37°C. Se recogió 1 ml del cultivo y se centrifugó a 4.000 rpm durante 10 minutos y el sedimento se resuspendió en 100 µl de solución estabilizadora SE (75 mM ClNa, 25 mM EDTA pH7,4). Se estandarizó el inóculo mediante espectrofotometría, y 100 µl de esta suspensión se mezclaron con 100 µl de agarosa D5 al 2% (Pronadisa, Madrid, España), dicha mezcla se depositó en moldes adecuados y se enfrió a 4°C durante 10 minutos. La agarosa D5 empleada para inmovilizar las células bacterianas por su valor de electroendosmosis menor de 0,120 permite gran movilidad.

Los bloques de agarosa formados se depositaron en tubos con 1 ml de solución de lisis (50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM EDTA pH 9,5, 1% sarcosyl y proteinasa K 1 mg/ml) y se incubaron durante 16 horas a 56°C con agitación. De esta manera se rompen las células que contienen los bloques.

Posteriormente, se decantó la solución anterior y se sustituyó por 1 ml de solución TE (10 mM Tris ClH pH 8, 0,1 mM EDTA) incubándose nuevamente durante 15 minutos a 56°C. El objetivo de los lavados es arrastrar fuera del bloque todos los restos celulares y de reactivos empleados que puedan inhibir la restricción posterior. Los bloques de agarosa se lavaron 2 veces más con 1 ml de TE durante 15 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital y después del último lavado se mantuvieron a 4°C en esta solución hasta su uso.

En tubos eppendorf de 1,5 ml con los números de cepa asignados, se depositó un tercio del bloque de agarosa y se añadieron 120 µl a cada muestra de la solución de restricción con 10 U de la enzima de restricción *SpeI* (Takara Bio Inc., Shiga, Japón) en el tampón de restricción (1x) específico de la enzima. La digestión se realizó a 37°C durante al menos 3 horas, y después se colocaron los bloques consecutivamente en cada uno de los dientes del peine, excepto en los extremos reservados para los controles de peso molecular, Lambda Ladder PFG Marker (48,5- 1000,18 kb) (New England Biolabs Inc., Ipswich, MA, EEUU). Se cargaron en un gel de agarosa D5 al 1,2% y se colocaron en el sistema de electroforesis que contenía 2 litros de tampón TBE (0,5 X).

Las condiciones que se aplicaron a la electroforesis fueron: 5-40 seg durante 22 horas a 6 v/cm² y 14°C. Se visualizó el gel en el transiluminador de luz ultravioleta y se fotografía con el programa Gel Logic 100 Imaging System (Carastream Health Inc., Rochester, NY, EEUU).

Para la interpretación de los resultados se utilizaron los conceptos de Tenover (Tenover F. y cols., 1995) con el que se puede clasificar a los aislados bacterianos en cuatro categorías:

- cepas indistinguibles o idénticas, si presentan el mismo número de bandas y estas tienen aparentemente el mismo tamaño.
- cepas estrechamente relacionadas, cuando el número de diferencias entre los dos aislamientos sea inferior o igual a 3.
- cepas posiblemente relacionadas, cuando los cambios entre los dos patrones pueden ser atribuidos a dos hechos genéticos independientes, el número de cambios puede llegar a ser hasta de 6 (inserciones o deleciones de ADN; o ganancia o pérdida de lugares de restricción).
- cepas no relacionadas, Cuando los cambios entre los dos patrones son atribuibles a tres o más cambios genéticos independientes, lo cual se traduce en un número de diferencias entre los dos patrones superior a 6.

Posteriormente se construyó un dendrograma de similitud genética utilizando el software Phoretix 5.0 con el índice de diversidad de Dice que considera que los aislados que presentan una relación entre 0,9-1 son idénticas, entre 0,8-0,89 son estrechamente relacionadas, entre 0,7-0,79 son posiblemente relacionadas, y por debajo de 0,69 no tienen ningún tipo de relación genética.

6.2 MultiLocus Sequence Typing (MLST)

Uno de los protocolos empleados comúnmente para abordar estudios epidemiológicos es MLST (Multiple-Locus Sequence Typing), basado en el análisis de la secuencia de varios *loci* genéticos. Esta técnica consiste en

amplificar y comparar las secuencias de siete genes altamente conservados y que son imprescindibles para el mantenimiento celular ("housekeeping genes"), asignando un número a cada alelo. Las distintas combinaciones de alelos se asignaron con su correspondiente secuencia tipo (ST) según las bases de datos correspondiente a *P. aeruginosa* recogidas en la página web desarrollada por Keith Jolley en la Universidad de Oxford: <http://pubmlst.org/paeruginosa/>.

Los genes utilizados en este esquema de MLST fueron: *acsA* (Acetyl coenzyme A synthetase), *aroE* (Shikimate dehydrogenase), *guaA* (GMP synthase), *mutL* (DNA mismatch repair protein), *nuoD* (NADH dehydrogenase I chain C, D), *ppsA* (Phosphoenolpyruvate synthase) y *trpE* (Anthralite synthetase component I).

La amplificación de los distintos genes se realizó a partir de ADN genómico extraído mediante el kit comercial MOBIO Q (Mo Bio, Bacterial Barcodes, Carlsbad, CA, EEUU). Los cebadores utilizados así como las condiciones de amplificación se encuentran recogidas disponibles en la página web y se comprobó mediante electroforesis en agarosa la correcta amplificación de los genes.

Los productos de PCR obtenidos se purifican con ExoSAP-it[®] purification kit (USB CORP., Cleveland, OH, EEUU) y fueron secuenciados por (<http://www.macrogen.com>) utilizando un secuenciador automático 373XL DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). El análisis de las secuencias nucleotídicas se realizó mediante el programa Chromas Lite (versión 2.1, Technalysian Pty. Ltd, Tewantin, Australia).

Las secuencias de cada gen se alinearon con el alelo número 1 de cada uno de los genes mediante la aplicación ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk>) y la asignación del alelo correspondiente se realizó a través de la página web <http://pubmlst.org/paeruginosa/>. La comparación y determinación de los complejos clonales se realizó mediante el algoritmo goEburst (goeburst.phyloviz.net) y además se estudió la relación filogenética de cada cepa mediante el análisis de la concatenación de los 7 genes de MLST y el programa MEGA 5.0.

6.3 rep-PCR DiversiLab

Las técnicas de tipificación basadas en la reacción PCR involucran la amplificación de genes o de secuencias de ADN, entre ellas la rep-PCR (Repetitive Extragenic Palindromic-PCR). Los elementos REP son secuencias de ADN extragénicas, cortas, repetidas y esparcidas en el genoma de las bacterias. Las secuencias REP son elementos palindrómicos de 21-65 pb (Tobes & Pareja, 2006). La rep-PCR emplea iniciadores que reconocen las secuencias conservadas REP, y las regiones amplificadas corresponden a los segmentos que separan dichas secuencias. Así, el polimorfismo generado dependerá de la variedad en la distribución de las repeticiones y de la distancia entre las secuencias REP dentro del genoma.

En nuestro caso, esta técnica se realizó mediante la aplicación del sistema comercial semiautomático DiversiLab® (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). El equipo Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) utiliza una tecnología de microfluidos LabChip para integrar los pasos individuales de la electroforesis tradicional en un solo proceso automatizado. Las muestras de ADN se separan dentro de los microcanales del chip de ADN. A medida que los fragmentos separados de ADN atraviesan un haz láser, se genera una identificación genética de ADN en la forma de un electroferograma. Se comparan la identificación genética proveniente de diversas muestras utilizando el programa DiversiLab®, versión 3.4 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia).

Se utilizaron los protocolos comerciales para todo el sistema DiversiLab: DiversiLab® Recommendations for Mo Bio UltraClean Microbial DNA Isolation Kit, DiversiLab® LabChip Devices, DiversiLab®Pseudomonas Kit, DiversiLab® Software Guide (For Software Version 3.4), DiversiLab® Analysis Guide (For Software Version 3.4). Los pasos principales y los materiales que se han empleado para generar la identificación genética de ADN rep-PCR son los siguientes:

Se realizó la extracción del ADN de cultivos microbianos purificados mediante el kit comercial de extracción Ultra Clean (Mo Bio, Bacterial Barcodes, Carlsbad, CA, EEUU, un sistema de extracción manual en

columna. La cuantificación del ADN total extraído se realizó espectrofotométricamente con el NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, EEUU) a 260 nm, y para favorecer la estandarización se ajustó la cantidad de ADN entre 25 y 50 µg. La máster mix que se preparó para la reacción de PCR (volumen final de 23 µl) contenía 18 µl de Rep-OCR MM1, 2,5 µl de GeneAmp 10X PCR Buffer, 2 µl de Primer Mix y 0,5 µl de AmpliTaq DNA Polymerase. Se utilizó la enzima Ampli Taq DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Foster City, CA, EEUU), y las condiciones de amplificación programadas en el termociclador MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., MINN, EEUU) fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante dos minutos; 35 ciclos de: 30 segundos a 94 °C (desnaturalización), 30 segundos a 50 °C (hibridación) y 90 segundos a 70 °C (extensión), y una extensión final de 3 minutos a 70 °C

Para separar los fragmentos de ADN generados en la rep-PCR se utilizaron para cargar el Labchip los reactivos necesarios suministrados por Biomerieux como colorante, matriz-gel y marcador (150 bp y 7000 pb). Se comparó la identificación genética utilizando la función de análisis estadístico del programa DiversiLab[®], versión 3.4 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia). A partir de los geles virtuales, se identifican los patrones que permiten el agrupamiento de los aislados aplicando la herramienta de análisis proporcionada por el sistema DiversiLab.

Por tanto, la herramienta de análisis permite separar los aislados bacterianos en “muestras con patrones indistinguibles” y “en grupos de muestras similares”.

Los resultados se pueden representar en dendrogramas y en matrices de similitud. Los dendrogramas muestran la correlación media de cada par de muestras representadas en las ramas del dendrograma, mientras que en la matriz de similitud se muestra el porcentaje de correlación de cada muestra comparada con cada una de las otras muestras.

6.4 Espectrometría de masas MALDI-TOF

La espectrometría de masas MALDI-TOF se denomina MALDI por sus siglas en inglés Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (desorción/ionización por láser asistida por matriz) y TOF por el

analizador Time of Flight (tiempo de vuelo). En este tipo de espectrometría es de suma importancia la matriz orgánica ya que funciona como un transmisor, transfiriendo la energía necesaria para la ionización, del láser a las moléculas de la muestra. La mezcla muestra-matriz debe cristalizar de forma homogénea para garantizar una resolución óptima del espectro. El proceso se puede resumir en los siguientes pasos:

La muestra se mezcla con una matriz en exceso sobre una superficie de metal (tarjeta metálica), de tal forma que ambas co-cristalizan cuando se evapora el solvente. Se irradia esta preparación con un láser, en condiciones de alto vacío. La matriz absorbe esta energía y la transfiere a la muestra, provocando su ionización. El área irradiada, de unas pocas micras, se calienta dando lugar a la desorción de los iones de fase sólida a fase gaseosa. La muestra ionizada y vaporizada crea una densa nube de gas entre dos electrodos. El campo eléctrico formado se emplea para acelerar la muestra hasta el detector. Los iones más ligeros experimentan una mayor aceleración, viajan más rápido y llegan primero al detector, y finalmente en el detector se genera el perfil o huella química específico de esa muestra.

Basadas en la espectrometría de masas MALDI-TOF se han desarrollado varios sistemas que son capaces de realizar la identificación de un gran número de bacterias y hongos a través de la detección de proteínas ribosómicas S y L (citoplasmáticas, conservadas, abundantes y de carga positiva, esto último favorece su medición) en el rango de 2.000 a 20.000 Da. Se asume que el 80-90% de las señales del espectro de la bacteria son proteínas ribosomales, permitiendo destacar a esta técnica por su reproducibilidad, ya que no presenta diferencias en el espectro obtenido bajo distintas condiciones de cultivo.

Cada sistema comercial que emplea la espectrometría de masas MALDI-TOF para identificación microbiana recomienda sus propios protocolos para la preparación de la muestra y tienen asociada una base de datos distinta, junto con un programa informático para la adquisición de los espectros y comparación con la base de datos.

En este caso, las medidas de espectrometría de masas MALDI-TOF se han realizado con el espectrómetro microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Leipzig, Germany) provisto de un láser de nitrógeno a 20-Hz. Los espectros se adquieren mediante el programa Flex Control, en el método lineal positivo con un voltaje de aceleración de 20kV y se analizan en un rango de masas desde 2000 a 20000 Da. Cada serie de medidas se precede de una calibración con un patrón proporcionado por Bruker Daltonik, el cual contiene una mezcla de proteínas conocidas. En la calibración la desviación máxima no debe ser superior a 300 ppm. Para el procesamiento de los espectros se ha empleado el programa flexAnalysis.

En el sistema MALDI Biotyper, la base de datos está formada por entradas que corresponden al espectro promedio (de al menos 24 espectros de alta calidad) de un microorganismo concreto (genero, especie y cepa).

Para visualizar la correlación entre los organismos y su agrupamiento (clustering), se calcula un dendrograma con el MALDI BioTyper software. Los valores de las distancias en un dendrograma son relativos y siempre se normalizan a un valor máximo de 1000.

Se utilizó el procedimiento de extracción indicado por la empresa distribuidora (Soria Melguizo), modificado del procedimiento del fabricante (Bruker), detallado a continuación (Figura 15):

1. Poner en un tubo eppendorf 300 µl de agua grado HPLC y resuspender un asa del cultivo bacteriano.
2. Añadir 900 µl de etanol absoluto y agitar en vortex hasta tener una suspensión homogénea.
3. Centrifugar 1-2 minutos a máxima velocidad y decantar el sobrenadante volcando el tubo eppendorf para quedarnos con el pellet.
4. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad para eliminar restos de etanol y quitar el sobrenadante (resto de etanol), y en caso

necesario, dejar el tapón con el tubo abierto un mínimo de 15 min para que se seque completamente el sedimento.

5. Añadir 25 μ l de ácido fórmico al 70% y resuspender el sedimento con una pipeta hasta completa disolución y después agitar en vortex.
6. Añadir 25 μ l de acetonitrilo y mezclar.
7. Centrifugar 1 minuto a máxima velocidad y transferir 1 μ l del sobrenadante al punto de la tarjeta de metal.
8. Dejar secar y añadir 1 μ l de la solución de matriz, que es una solución saturada de ácido α -ciano-4-hidroxycinámico disuelto en un solvente orgánico básico compuesto de 50% acetonitrilo y 2.5% ácido trifluoracético.
9. Dejar secar y realizar la lectura.

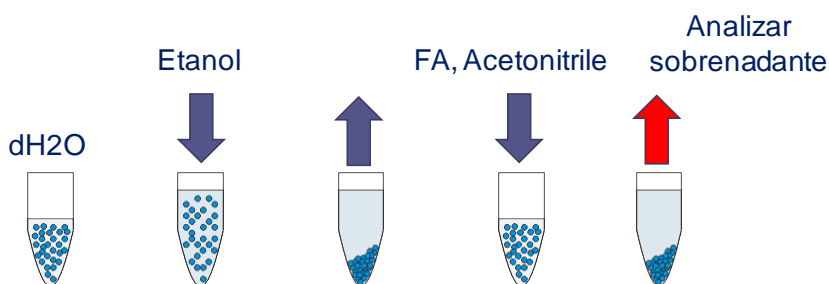


Figura 15. Esquema del proceso de extracción

Para investigar la precisión y la reproducibilidad del MALDI Biotyper en la identificación se han estudiado 50 *P. aeruginosa* aisladas de muestras respiratorias de pacientes con fibrosis quística que presentaban diversos morfotipos, siendo 16 rugosas, 13 mucosas, 9 enterobactereaceas, 8 puntiformes o Small Colony Variant (SCV) y 4 metálicas. Se ha empleado el método directo de inoculación de la tarjeta,

sin extracción previa para mimetizar las condiciones de uso en la rutina diaria.

También se diseñaron y realizaron varios estudios para analizar la reproducibilidad de los espectros que se obtienen mediante espectrometría MALDI-TOF y comprobar que son adecuados para utilizarlos en estudios epidemiológicos de bacterias. Se comprobó la influencia de: fecha (calibración, reactivos), cultivo (pase fresco, medios de cultivo: Agar Sangre, McConkey, Mueller-Hinton, Luria-Bertani), reactivos de extracción, .

En el proceso de adaptación de las técnicas de espectrometría de masas para el análisis de la clonalidad, comenzamos por afianzar el procedimiento para establecer una nueva base de datos o librería de referencia de espectros ("huella espectral"). Se comprueba que coincidan los parámetros de calibración del espectro del BTS con cada uno de los espectros. Si es correcto, se realiza el suavizado (smoothing) y sustracción de la línea base (baseline substration) y se analizan detalladamente con el programa flexAnalysis, con especial cuidado en los picos no correlacionados (intrusive peaks) o espectros desplazados respecto a los demás. Una vez que los 24 espectros son procesados por el programa informático MALDI Biotyper, empleando la herramienta para crear una nueva MSP, se obtienen un espectro representativo para esa muestra con 70 valores m/z. Esos espectros se compararon con el software MALDI BioTyper 3.0 que incorpora la base de datos MALDI BioTyper y nuestra propia base de datos de *P. aeruginosa*.

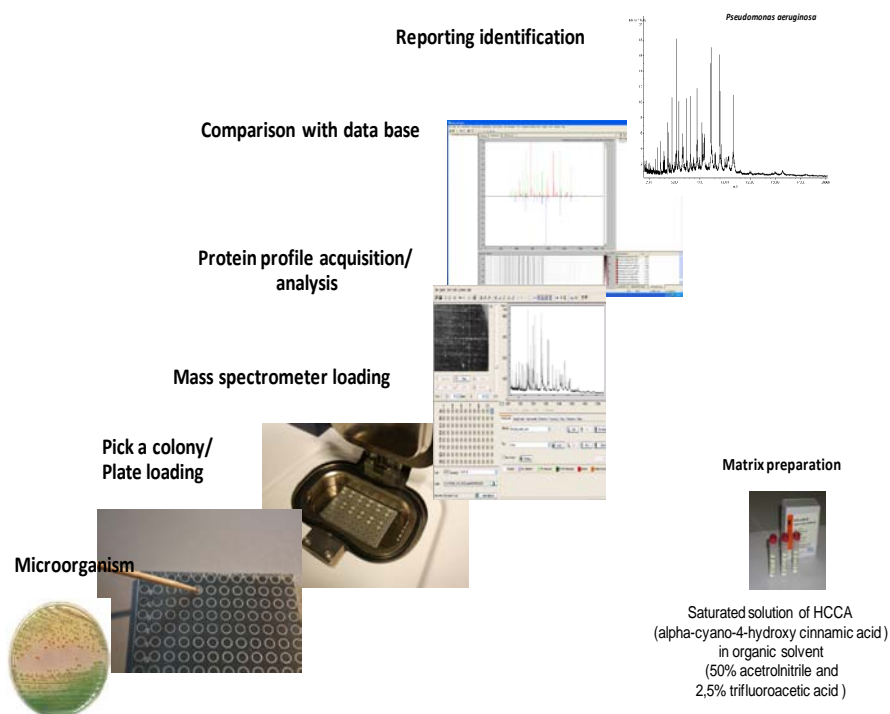


Figura 16. Flujo de trabajo EM MALDI-TOF

Por ultimo, para estudiar la población de cepas clínicas se ha utilizado la herramienta del dendrograma del MALDI Biotyper. Los dendrogramas muestran de manera gráfica las relaciones entre las cepas, quedado representada de forma agrupada en ramas aquellas cepas con mayor similitud.

Se estudió la clonalidad de las cepas de primocolonización en varios pacientes FQ donde la mayoría de cepas presentaba PFGE distinto y se realizó un estudio de seguimiento de los pacientes, tanto con cepas con PFGE constante como y en aquellos que no se mantiene de manera constante a lo largo de los años, tiene algunas variaciones (en alguna de las bandas del PFGE).

7. Estudio de la detección precoz de *P. aeruginosa*

7.1 Selección de pacientes y muestras

Nos propusimos utilizar técnicas de Microbiología Molecular con el objetivo de detectar precozmente la existencia de *P. aeruginosa* en las muestras respiratorias de los pacientes con FQ. En primer lugar, se seleccionaron 34 pacientes que no estaban colonizados por *P. aeruginosa*, aunque en alguna ocasión hubieran presentado aislamientos esporádicos que no cronificaron.

Desde diciembre del 2005 a diciembre del 2008, se recogieron prospectivamente alícuotas de las muestras respiratorias de los 34 pacientes seleccionados que fueron enviadas a nuestro Servicio. Este grupo de pacientes, incluye a los 23 pacientes vacunados frente a *P. aeruginosa* y solamente en 8 pacientes (23%) se había obtenido algún aislamiento de *P. aeruginosa* entre 1994-2005.

Se coleccionaron un total de 321 muestras respiratorias. Se comprobó que el uso de N-acetilcisteína para licuar la muestra no afectaba en la PCR realizando pruebas de amplificación con una misma muestra con y sin N-acetilcisteína.

Las muestras se alicuotaron en la cabina de seguridad biológica con material de protección personal (guantes, bata y mascarilla), y se conservaron a -70°C . Se extrajo el ADN con el sistema NucliSENS easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia), que es una plataforma para el aislamiento semiautomatizado de ácidos nucleicos a partir de muestras clínicas, basada en la tecnología de extracción con sílice (también denominada tecnología BOOM) optimizada con el empleo de partículas magnéticas. En el caso de nuestras muestras se empleó un procedimiento de extracción genérico (BioMérieux easyMAG Nuclisens protocol Generic 2.0.1), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

En todas las muestras se realizó una amplificación con los cebadores para los genes *oprL* (“lipoproteína externa de membrana”, “outer membrane lipoprotein”) (De Vos y cols., 1997; Xu y cols., 2004) y *mucA* (nt 42 a 544) (Bragonzi y cols., 2006) (Pozuelo, y cols., 2011). De forma adicional se empleo un cebador con la diana de amplio espectro de

eubacterias 16S ADNr para verificar una extracción correcta del ADN bacteriano de cada muestra y para comprobar que no se producía una inhibición de la PCR. Los oligonucleótidos y las condiciones optimizadas para la amplificación por PCR se detallan en la [Tabla 3](#).

Tabla 3 . Características de la amplificación por PCR

Gen	Secuencia cebadores (5'....3')	Tª	Tamaño del amplicon (pb)
16SADNr	f: 5'-AGG ATT AGA TAC CCT GGT AGT CCA-3' r: 5'-ACT TAA CCC AAC ATC TCA CGA CAC-3'	55 °C	312
<i>oprL</i>	f: 5'-ATG GAA ATG CTG AAA TTC GGC-3' r: 5'-CTT CTT CAG CTC GAC GCG ACG-3'	55 °C	504
<i>mucA</i>	f: 5'-GGA TAA CGA AGC GGA TGA AC-3' r: 5'-CGC TCT CTG TAG CAC TGA CG-3'	55 °C	623

La PCR se realizó en un volumen final de 20 µl, añadiendo 1 µl de ADN, 1 µl de la enzima Takara Taq (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), y 2 µl de cada cebador (100 pmol) que habían sido proporcionado por la casa comercial Sigma (Sigma-Aldrich Química, Madrid, España). Se utilizó en cada reacción un control positivo (ADN de *P. aeruginosa* ATCC 27853) y un control negativo (agua destilada estéril). La reacción se llevo a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100 (Global Medical Instrumentation Inc., MINN, EEUU), con las siguientes condiciones (Xu, y cols., 2004): 1 ciclo de 12 minutos a 94 °C, seguido de 40 ciclos de: 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 30 segundos a 72 °C, y una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis convencional en un gel de agarosa al 2 % (Agarosa D-1 low EEO; (Pronadisa, Madrid, España) preparada con tampón TBE 0,5X. Esta agarosa con baja electrendosmosis (0,05 – 0,13%) permite una gran movilidad.

Los geles se visualizaron empleando un transiluminador con cámara fotográfica después de teñirlos con bromuro de etidio (concentración 0,2 µg/ml). En todos los geles se compararon las migraciones electroforéticas de la muestra con las de un patrón de peso molecular conocido, el patrón 100 bp ADN Ladder (100 a 1500 pb) (Takara Bio Inc., Shiga, Japón).

En todas las muestras se testó la correcta amplificación con los cebadores para poder garantizar una correcta extracción del ADN bacteriano y/o una falta de inhibición de la PCR. Cuando no se obtuvo un resultado positivo se descartó la muestra. Se consideró que una muestra era positiva para *P. aeruginosa* cuando se obtuvo amplificación positiva en los dos cebadores específicos (*oprL*, *mucA*), y cuando únicamente se obtuvo amplificación en uno de los dos, se clasificó a la muestra como dudosa.

Se determinaron los índices de validez siguientes: Sensibilidad (Sen), Especificidad (Esp), Proporción de falsos positivos (PFP), Proporción de falsos negativos (PFN), Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN) en base a las formulas de www.hrc.es/bioest/validez_1.html.



RESULTADOS

1. EVOLUCIÓN DE LA COLONIZACIÓN EN PACIENTES DE LA UNIDAD DE FQ

En primer lugar realizamos un estudio retrospectivo con los pacientes de nuestra Unidad comparando cuatro periodos de tiempo. Los datos referentes al período A (1993-1995, 81 pacientes) y el periodo B (2002-2003, 127 pacientes) fueron previamente analizados en una tesis anterior y en el presente trabajo se compararon con los obtenidos los periodos C (2006-2007, n=183 pacientes) y D (2010-2011, 197 pacientes). En la Figura 17 se representa la distribución de pacientes según el grupo de edad al que pertenecen.

En el periodo A, la media de edad de los pacientes incluidos (16,9 años) era inferior al resto de periodos, con una representación muy numerosa de pacientes de 16 a 20 años. En el periodo B, la media de edad aumentó a 25,4 años, probablemente debido al aumento de su esperanza de vida. En el periodo D, la media no superaban los 20 años, reflejando la incorporación en la Unidad de pacientes nuevos de menor edad como por ejemplo los recién nacidos diagnosticados mediante cribado.

El 55% de los pacientes del grupo A no estaban incluidos en el B porque cambiaron de centro hospitalario o fallecieron. El 52% de los pacientes del periodo C continuaron su seguimiento en nuestra Unidad quedando incluidos también en el periodo D.

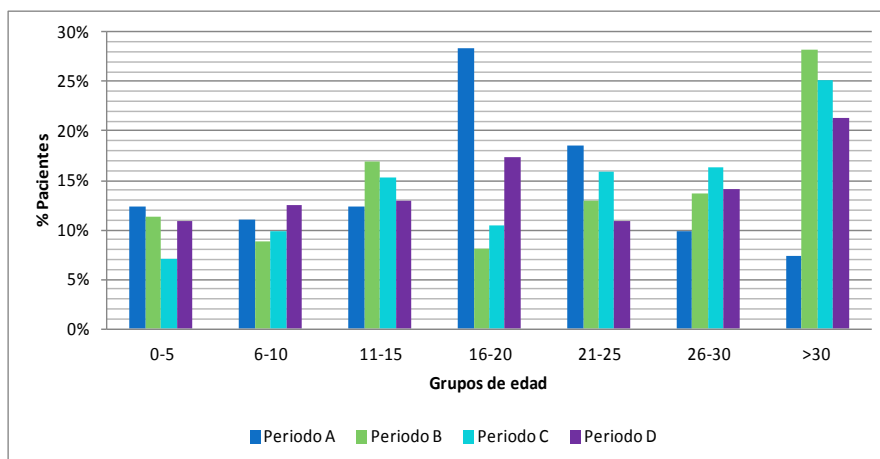


Figura 17. Distribución por grupos etarios de los pacientes incluidos en los periodos A, B, C y D.

1.1. Patrón general y evolución de la colonización broncopulmonar

Los microorganismos detectados en las muestras respiratorias fue similar en todos los periodos de estudio, con la excepción de *Chryseobacterium indologenes* (solo en periodo D) y *Achromobacter xylosoxidans* (en periodo B y D) (Figura 18). *S. aureus* fue el microorganismos más frecuente en todos los periodos evaluados (A 75%, B 58%, C 58% y D 64%), y *P. aeruginosa* también fue mayoritario aunque disminuyó progresivamente (A 69%, B 51%, C 45% y D 35%). *H. influenzae* fue el tercer microorganismo con un incremento a lo largo de los años, seguido de *S. pneumoniae* y *S. maltophilia*.

Los bacilos Gram negativos no fermentadores como *B. cepacia* complex, *Acinetobacter spp.*, *A. xylosoxidans* y *C. indologenes* representaron porcentajes muy minoritarios. *C. indologenes* fue únicamente aislado en el periodo D en 15 pacientes adultos.

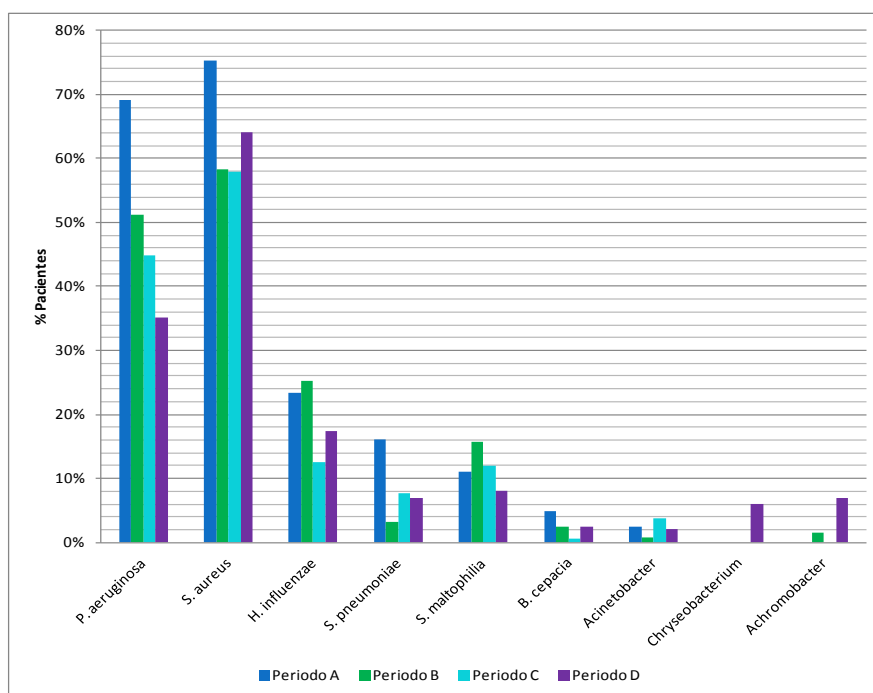


Figura 18. Porcentaje de pacientes colonizados/infectados por los diferentes microorganismos en cada periodo de estudio.

La coexistencia de varios microorganismos en el pulmón de los pacientes con FQ es un hecho muy frecuente. Los datos de co-colonización obtenidos en nuestro estudio se reflejan en la Figura 19. Los microorganismos que más frecuentemente se detectaron en conjunto fueron *P. aeruginosa* y *S. aureus* (A 38%, B 31%, C 28% y D 27%).

En el caso de que *P. aeruginosa* no estuviera presente, se observan diversas combinaciones, observando un aumento significativo de *S. aureus* con *H. influenzae* del 5% en periodo A al 27% en periodo B ($p < 0,005$).

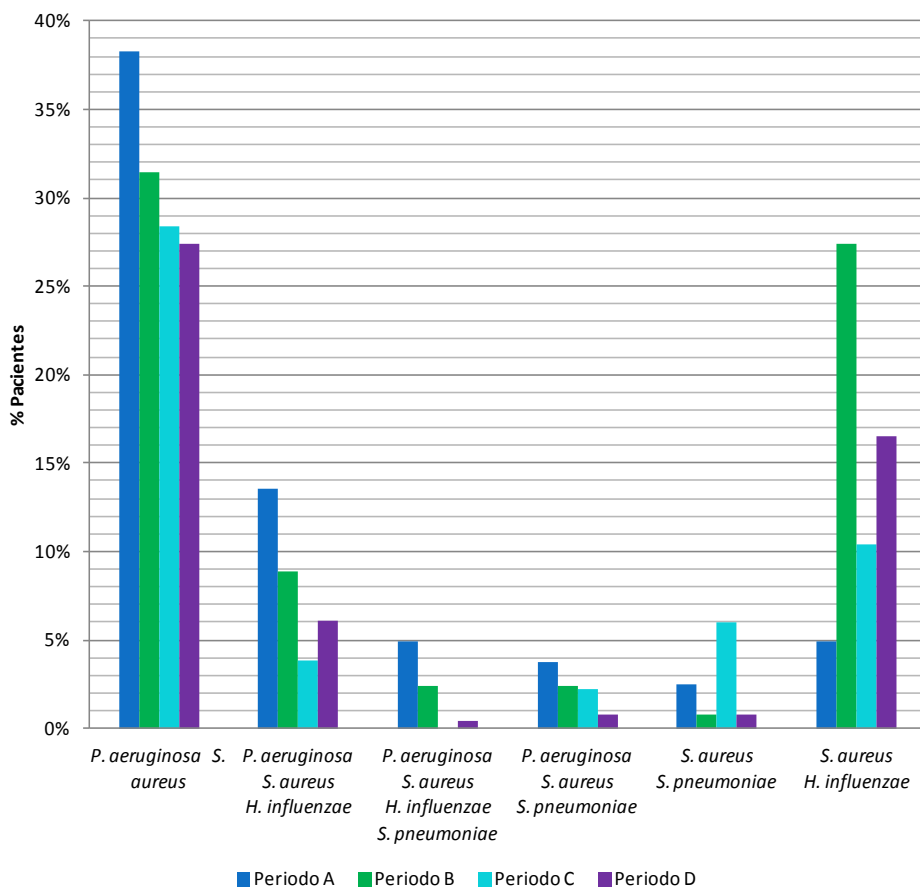


Figura 19. Porcentaje de pacientes colonizados/infectados por más de un microorganismo.

1.2. *P. aeruginosa* en pacientes con FQ

P. aeruginosa se aisló en el 69,1% de las muestras respiratorias de los pacientes incluidos en el período A, disminuyendo su prevalencia en los siguientes periodos (B 51,2%; C 45%; y D 35,1%). Cuando se analizó la edad de los pacientes, se pudo observar un retraso en el inicio de la colonización en los últimos años de estudio, especialmente en los pacientes menores de 5 años (A 50%, B 43%, C 30% y D 17%) y menores de 10 años (A 67%, B 55%, C 27%, y D 8%) (Figura 20).

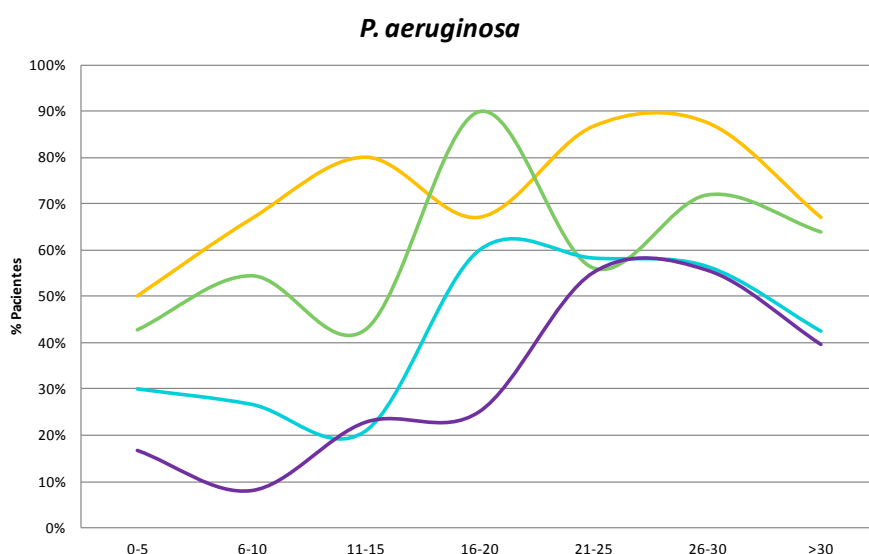


Figura 20. Distribución de *P. aeruginosa* según grupo de edad y periodo.

Se analizó el número de cultivos positivos para *P. aeruginosa* durante un año, atendiendo a la clasificación de colonización intermitente (<50% de cultivos positivos), o crónica $\geq 50\%$ de cultivos positivos). Como se observa en la Figura 21, en todos los periodos y en las edades más tempranas la mayoría de los pacientes presentaban colonizaciones intermitentes, evolucionando desde el 70% del periodo A (1993-1995) al 100% del periodo D (2010-2011). Destaca que en el periodo C la mayoría de los pacientes con edades entre los 6 y 10 años presentaban colonización/ infección crónica por *P. aeruginosa*.

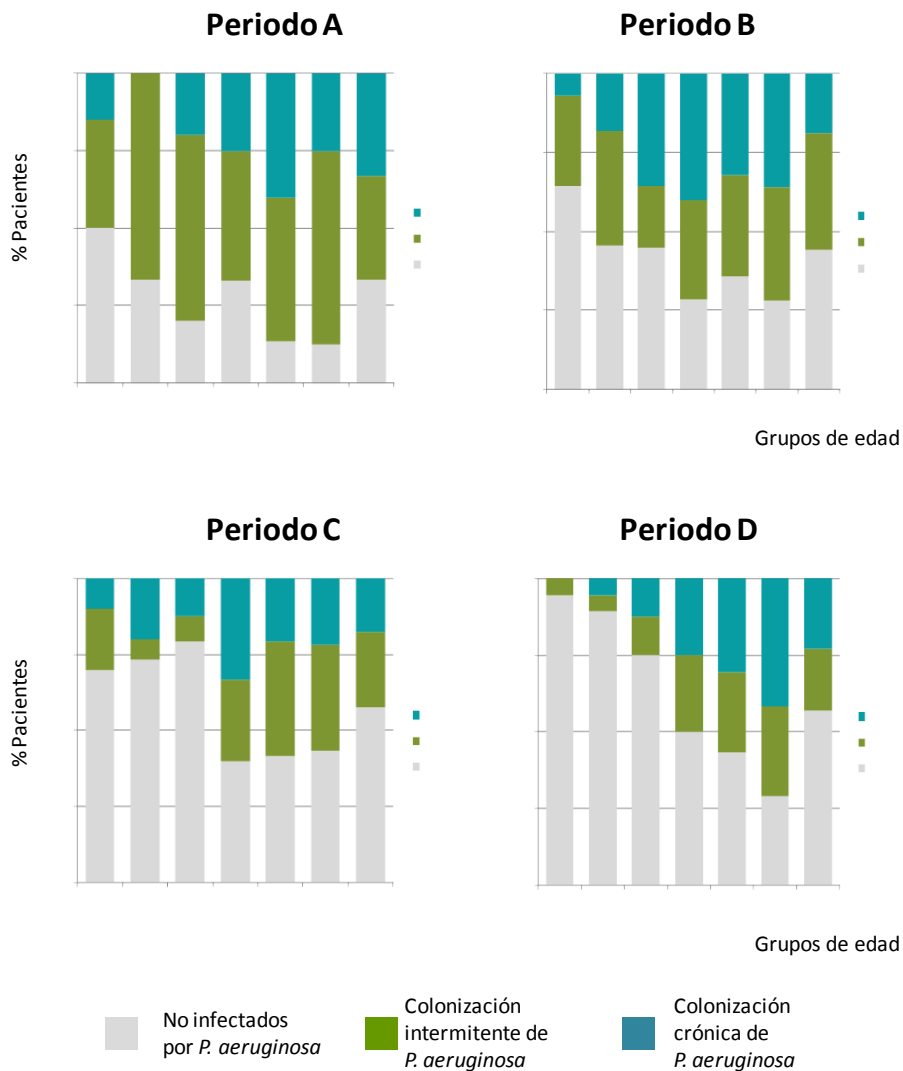


Figura 21. Distribución de la colonización/infección por *P. aeruginosa* según el grupo de edad de los pacientes de cada periodo estudiado.

Los aislados de *P. aeruginosa* pueden presentar diferentes características morfológicas que según avanza la colonización/infección suele definirse en un morfotipo mucoso. Las variaciones en la frecuencia de los diferentes morfotipos se reflejan en la Figura 22. Es importante señalar que en una misma muestra pueden coexistir varios morfotipos.

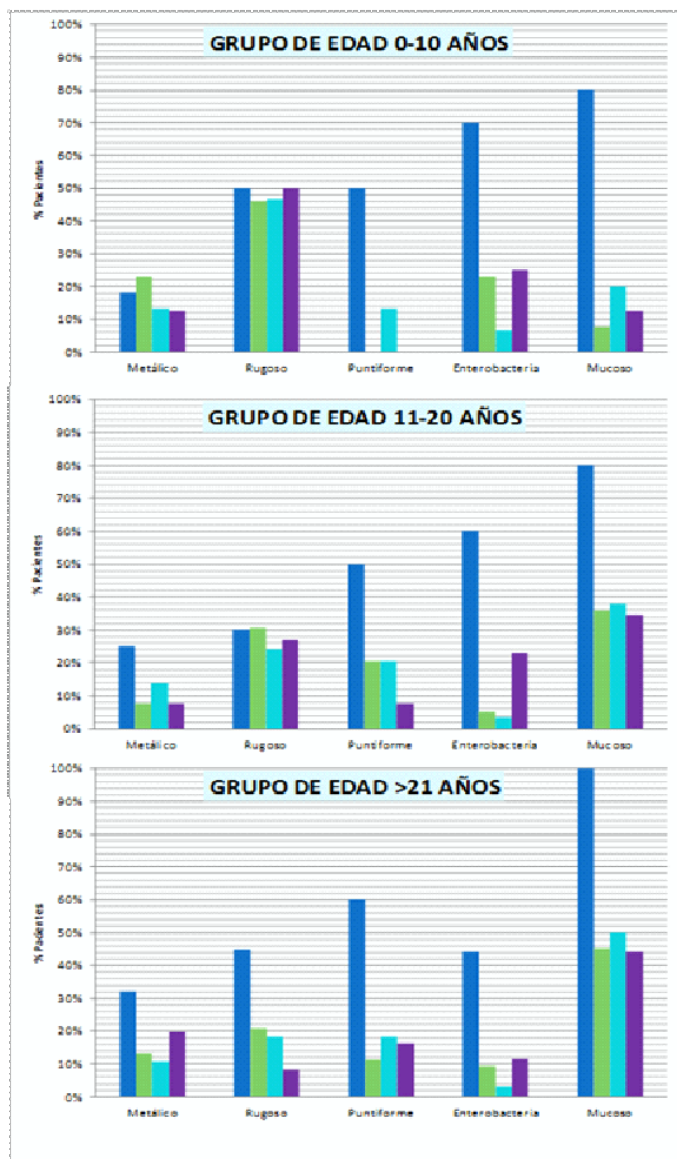


Figura 22. Distribución de los diferentes morfotipos de *P. aeruginosa* según el grupo de edad al que pertenecían los pacientes de cada periodo estudiado.

2. PACIENTES CON PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

2.1 Características clínicas de los pacientes

Dentro del periodo de estudio (1993-2011), detectamos eventos de primocolonización por *P. aeruginosa* en 25 pacientes, y en todos ellos se realizó una revisión de la historia clínica del año anterior a la fecha del primer cultivo positivo. Se resumen las características clínicas basales de los pacientes en la [Tabla 4](#). En algunos casos no se dispuso de todos los datos clínicos del paciente durante el periodo de seguimiento por no poder acceder a la historia clínica completa (Paciente 4, Paciente 10, Paciente 20 y Paciente 21).

De los 25 pacientes seleccionados, 11 (44%) eran mujeres. Se realizó cribado neonatal únicamente en dos pacientes (Paciente 11 y Paciente 16). La edad media al diagnóstico de FQ fue de 3,5 años (rango <1 mes - 28,3 años) en los 21 pacientes en los que se dispone este dato. Es de destacar que en 15 de ellos (60%) se confirmó el diagnóstico antes de los 1,5 años de vida (edad media de 0,5 años; DE 0,4; IC 95%: 0,3 - 0,7) y en todos antes de los 10 años, exceptuando el Paciente 6 que fue diagnosticado en la edad adulta.

La mutación CFTR más frecuentemente encontrada fue F508del en un 83,3% de los pacientes, siendo en 9 de ellos en homocigosis (37%) y en 11 en heterocigosis (46%). La segunda mutación más frecuente fue G542X (3 pacientes, 13%). De acuerdo a la clase funcional de la mutación CFTR todos los pacientes tenían una actividad funcional mínima de CFTR, exceptuando el Paciente 6 con actividad residual ([Tabla 4](#)).

Un dato de especial importancia fue que la edad media en la que se detectó el primer aislado de *P. aeruginosa* era de 8,5 años (DE 9,6; IC 95%: 4,7 - 12,2 con un rango de 0,4 a 36,5 años) (Figura 23). Si tenemos solo en cuenta a la población pediátrica, la edad de su primer aislamiento de *P. aeruginosa* fue de 5,6 años (DE 5,4; IC 95%: 3,3 - 7,9; rango de 0,4 a

16,8 años). Aproximadamente la mitad de los pacientes (48%) recibieron la vacuna frente a *P. aeruginosa* durante su participación en un ensayo clínico realizado en nuestro centro. La edad media de adquisición de *P. aeruginosa* en este subgrupo vacunado fue ligeramente inferior (5,3 años) respecto al total de pacientes pediátricos (5,6 años). En 7 pacientes (20%), el primer aislamiento de *P. aeruginosa* ocurrió en su primer año de vida (Paciente 11, Paciente 13, Paciente 18, Paciente 22, Paciente 23 y Paciente 24). En otros 16 pacientes (64%), la primera *P. aeruginosa* fue aislada antes de los 7 años de edad (edad media de 2,6 años, DE 2,1; IC 95%: 1,5 - 3,7).

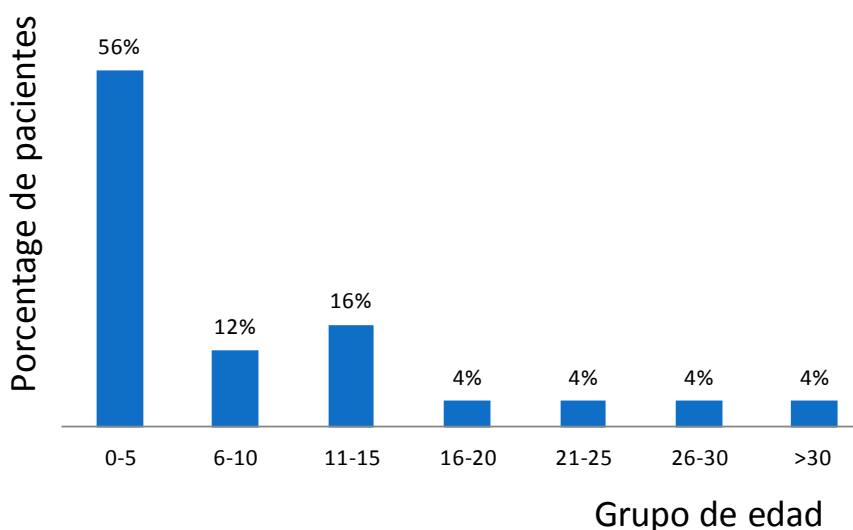


Figura 23. Edades de los 25 pacientes en el momento de la primocolonización por *P. aeruginosa*.

De los 25 pacientes, 14 tuvieron posteriormente otros cultivos positivos para *P. aeruginosa* (56%), y en ellos el primer aislamiento ocurrió a una edad más temprana, 6,4 años (DE 5,5; IC 95%: 3,5 - 9,3), que en los otros 11 pacientes que no cronificaron, 11,1 años (DE 12,9; IC 95%: 3,4 - 18,7).

En la [Tabla 5](#) se resumen los tratamientos, antibioterapia, hospitalizaciones, estado nutricional representado por el percentil del

índice de masa corporal (IMC) y otras complicaciones asociadas a la FQ durante el año previo al primer aislamiento de *P. aeruginosa* que hubieran podido actuar como factor de riesgo para la adquisición de este microorganismo. Ninguno de los pacientes fue remitido desde otro centro hospitalario a nuestra institución con informes de colonización/infección por *P. aeruginosa*.

Durante el año previo de la primocolonización, el empleo de broncodilatadores (40%) fue mayor que el de mucolíticos (20%). Curiosamente, el grupo de los 15 pacientes que no recibieron broncodilatadores tuvieron el primer aislamiento de *P. aeruginosa* a una temprana edad (media 5,4 años; DE 5,6; IC 95%: 3,1 - 7,8). La utilización de SSH, corticoides inhalados o corticoides por vía oral se produjo en un 12 % de los casos (3 pacientes) mientras que la dornasa alfa (DNasa) fue empleada solo por un paciente (Paciente 4).

Con respecto a las complicaciones asociadas a la FQ, 23 de los pacientes (92%) incluidos en nuestro estudio, presentaban insuficiencia pancreática y tomaban enzimas pancreáticas, mientras que el ácido ursodeoxicólico era requerido por el 44% de ellos (11 pacientes). El diagnóstico de enfermedad hepática sin cirrosis se hizo en un 28% (7 pacientes). En relación a la existencia de bronquiectasias, podemos comentar que fueron observadas por alguna técnica de imagen en un 12% (3 pacientes). Una complicación poco frecuente fue la hemoptisis, que presentaron dos de nuestros pacientes, en uno fue de carácter leve (Paciente 6) y en otro moderado (Paciente 12). En el Paciente 19 se manifestó una diabetes *mellitus* relacionada con la FQ, y también se diagnosticaron de aspergilosis broncopulmonar alérgica dos pacientes (Pacientes 6 y Paciente 21). No se encontró relación entre el IMC de los pacientes y la primocolonización.

En el seguimiento de los pacientes en el tiempo de duración de este estudio previo al aislamiento de *P. aeruginosa* un 24% (6 pacientes) requirieron un ingreso en un centro hospitalario. La primocolonización/infección por *P. aeruginosa* no se detectó mientras los pacientes estaban hospitalizados.

Entre los 17 pacientes (68%) que recibieron tratamiento antimicrobiano previamente, fue empleada la vía oral por 15 de ellos. Los antimicrobianos más utilizados fueron cefuroxima y amoxicilina-clavulánico (5 pacientes, 20%, cada uno de ellos), seguidos de cotrimoxazol y ciprofloxacino (3 pacientes, 12% para cada uno), cloxacilina y azitromicina (2 pacientes, 8%), gentamicina y levofloxacino (1 paciente, 4%) y por último, claritromicina y fosfomicina (1 paciente, 4%). La administración de antibioterapia previa nebulizada (vancomicina) o intravenosa (ceftriaxona) sucedió en un paciente cada uno. En 8 de los casos descritos anteriormente, los antimicrobianos se administraron en asociación. El motivo de recibir este tratamiento antimicrobiano en 10 de los pacientes (58%) fue porque se detectó colonización elevada o con un aumento de *S. aureus* en el esputo. En estos 10 pacientes se aisló la primera *P. aeruginosa* a una edad media de 8,2 años (DE 6,43; IC 95%: 5,5 - 10,9).

Se realizaron de media dos cultivos durante el año previo a la aparición de *P. aeruginosa* en los 25 pacientes (rango 0 a 6 \geq 4 cultivos en 5 pacientes), destacando que *S. aureus* que estaba presente hasta en un 72% de los pacientes, como único aislado en la mitad de los casos (9 pacientes, 41%), y en la otra mitad simultáneamente con otros patógenos (Tabla 5).

En el Paciente 10 y Paciente 11 se aisló previamente *S. aureus*, *S. maltophilia* y *A. baumannii*, de forma conjunta, presentaron únicamente un cultivo positivo para *P. aeruginosa* (con una edad de 6,6 y 0,4 años, respectivamente). De forma similar ocurrió con el Paciente 1, colonizado crónicamente con *B. bronchiseptica* y con el Paciente 12, cuyo aislamiento de *Mycobacterium avium intracellulare* (MAI) fue descrito de forma prolongada durante cuatro años (2006-2009). En estos dos últimos pacientes *P. aeruginosa* se aisló a una edad superior a la de la media, en concreto de 36,5 y 16,8 años, respectivamente.

En resumen, la edad media del paciente cuando se aisló la primera *P. aeruginosa* fue de 8,5 años. En el 28% de los pacientes la primocolonización ocurrió en su primer año de vida, de los cuales el 71% presentó peores parámetros antropométricos. No se encontraron diferencias significativas en el subgrupo de los pacientes homocigóticos

F508del (37%), del sexo femenino (44%), con lugar de residencia habitual en un área metropolitana (60%) o que habían recibido tratamiento antimicrobiano para *S. aureus* durante el año previo al aislamiento de *P. aeruginosa* (58%). La edad media de adquisición de *P. aeruginosa* de los 22 pacientes pediátricos (88%) fue de 5,6 años. Esta edad media fue inferior (4,0 años) en los 7 pacientes (32%) que tenían un bajo percentil de índice de masa corporal (IMC inferior al percentil 10) (71% de ellos al año de vida), superior en los 16 (72%) con *S. aureus* durante el año previo al aislamiento de *P. aeruginosa* (6,2 años), y similar en el grupo de los 15 pacientes (68%) que no recibieron broncodilatadores previamente (5,4 años). En el subgrupo vacunado (48%) fue ligeramente inferior (5,3 años) respecto al grupo pediátrico no vacunado (6,0 años).

Los datos más relevantes obtenidos en las Historia Clínica de los pacientes con primocolonización se detallan en las fichas individualizadas que se muestran en el Anexo. Como se ha comentado anteriormente, en algunas ocasiones no se pudieron obtener todos los datos.

Una vez detectada la primocolonización por *P. aeruginosa*, el tratamiento antibiótico utilizado con fines de erradicación fue ciprofloxacino VO (60%) seguido de tobramicina IV en combinación con ceftazidima IV (20%) y ceftazidima IV (12%) y por último, en menor medida las asociaciones de ciprofloxacino VO con ceftazidima IV (4%) y estos dos últimos con tobramicina IV (4%). Posteriormente el tratamiento de mantenimiento de elección fue tobramicina inhalada (56%) seguida de azitromicina VO (24%) y en menor proporción la colistina inhalada (20%).

Tabla 4 . Características clínicas basales de los pacientes.

Nº Paciente	Sexo	Cribado neonatal	Edad al diagnóstico	Mutación CFTR	Actividad funcional CFTR	Residencia en área metropolitana	Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Año 1º <i>P. aeruginosa</i>	Unico año con cultivo positivo	Edad al aislar 1º <i>P. aeruginosa</i>
P1	V	No	ND	H	Min	Si	No	2002	Si	37
P2	M	No	ND	H	Min	Si	No	2007	Si	23
P3	V	No	0,2	Otros	Min	Si	Si	2000	No	6
P4	M	No	ND	H	Min	No	No	2002	No	15
P5	M	No	6,5	T	Min	Si	No	2001	No	7
P6	V	No	28,3	Otros	R	Si	No	2002	Si	28
P7	V	No	0,5	Otros	Min	Si	Si	2007	Si	3
P8	V	No	0,2	H	Min	No	No	2001	No	1
P9	M	No	9,0	T	Min	No	Si	2000	No	9
P10	V	No	ND	T	Min	Si	No	1994	Si	6
P11	M	+	0,1	Otros	Min	Si	No	2009	Si	0
P12	V	No	9,5	H	Min	No	Si	2007	Si	17
P13	V	No	0,4	T	Min	No	Si	2000	No	1
P14	M	No	ND	H	Min	No	No	1995	No	13
P15	V	No	1,0	T	Min	Si	Si	1997	No	2
P16	M	+	0,0	Otros	Min	Si	Si	2004	Si	2
P17	V	No	9,7	T	Min	Si	Si	2008	No	15
P18	V	No	0,0	T	Min	No	No	2008	Si	1
P19	M	No	0,4	Otros	Min	No	No	2003	No	12
P20	V	No	1,1	T	Min	Si	Si	2000	No	3
P21	M	No	0,6	H	Min	Si	Si	1994	No	2
P22	M	No	0,5	H	Min	No	Si	1999	No	0
P23	V	No	0,7	H	Min	Si	No	2003	No	1
P24	M	No	1,5	Otros	Min	No	No	2009	Si	1
P25	V	No	1,1	H	Min	Si	Si	2007	Si	3

M: mujer, V: varón, H: Homocigosis F508del, T: Heterocigosis F508del, Min: mínima,
R: residua, +: cribado neonatal realizado con resultado positivo

**Tabla 5 . Factores de riesgo durante el año previo al
primer aislamiento de *P. aeruginosa*. Parte 1.**

Nº Paciente	DNAsa	Mucolíticos	BD	Corticoides	SSH	EP	AUDC	S. aureus*	Hospitalización	Percentil IMC	Nº cultivos año previo
P1	No	No	Si	-	No	Si	Si	ND	No	No	2
P2	No	Si	Si	vo	No	Si	Si	No	No	No	3
P3	No	No	No	-	Si	Si	Si	No	No	No	1
P4	Si	No	No	-	No	Si	Si	Si	No	No	1
P5	No	No	No	-	No	Si	No	Si	No	Si	1
P6	No	No	Si	inh	No	Si	No	No	Si	No	0
P7	No	No	Si	-	Si	Si	No	No	No	No	6
P8	No	No	No	-	No	Si	Si	Si	Si	Si	3
P9	No	No	No	-	No	No	No	Si	No	No	0
P10	No	No	Si	-	No	Si	No	ND	No	No	ND
P11	No	Si	No	-	No	Si	No	-	Si	Si	0
P12	No	No	No	-	No	Si	Si	Si	Si	Si	5
P13	No	No	No	-	No	Si	No	Si	Si	Si	0
P14	No	Si	Si	-	No	Si	Si	Si	No	No	2
P15	No	No	No	-	No	Si	Si	ND	No	No	3
P16	No	No	No	-	No	Si	No	-	No	No	4
P17	No	Si	Si	vo-inh	No	Si	No	Si	No	No	3
P18	No	Si	Si	vo	Si	Si	No	No	Si	No	0
P19	No	No	No	-	No	Si	Si	No	No	No	5
P20	No	No	No	-	No	Si	No	No	No	No	4
P21	No	No	Si	inh	No	Si	Si	No	No	No	ND
P22	No	No	No	-	No	No	No	Si	No	No	0
P23	No	No	No	-	No	Si	No	ND	No	Si	0
P24	No	No	Si	-	No	Si	Si	-	No	Si	0
P25	No	No	No	-	No	Si	No	Si	No	No	3

BD: Broncodilatadores, AUDC: Ácido ursodeoxicólico, EP: enzimas pancreáticas, vo: vía oral, inh: inhalado, ND: no disponible,

Tabla 5. Factores de riesgo durante el año previo al primer aislamiento de *P. aeruginosa*. Parte 2.

Nº Paciente	Colonización previa	
	Complicaciones	
P1	IP, BE, EHSC	<i>S. aureus</i> / <i>B. bronchiseptica</i>
P2	IP, EHSC	<i>S. aureus</i>
P3	IP	<i>H. influenzae</i>
P4	IP	<i>S. aureus</i>
P5	IP, EHSC	<i>S. aureus</i> / <i>H. influenzae</i>
P6	IP, BE, HE, ABPA	ND
P7	No	<i>S. aureus</i>
P8	IP	<i>S. aureus</i>
P9	No	<i>S. aureus</i>
P10	IP	<i>S. aureus</i> / <i>S. maltophilia</i> / <i>A. baumannii</i>
P11	IP	<i>S. aureus</i> / <i>S. maltophilia</i> / <i>A. baumannii</i> / <i>E. coli</i>
P12	IP, BE, HE	<i>S. aureus</i> / <i>H. influenzae</i>
P13	IP	<i>S. aureus</i> / <i>S. pneumoniae</i>
P14	IP, EHSC	<i>S. aureus</i>
P15	No	<i>H. influenzae</i>
P16	IP	<i>H. parainfluenzae</i>
P17	IP, EHSC	<i>S. aureus</i> / <i>A. xylosoxidans</i>
P18	IP	ND
P19	IP, DMRFQ, EHSC	BGNF
P20	IP	<i>S. aureus</i> / <i>H. influenzae</i> / <i>S. pneumoniae</i>
P21	IP, ABPA	<i>S. aureus</i>
P22	IP	<i>S. aureus</i>
P23	IP	<i>S. aureus</i> / <i>A. baumannii</i>
P24	IP, EHSC	ND
P25	IP	<i>S. aureus</i>

IP: Insuficiencia pancreática, BE: Bronquiectasias, HE: Hemoptisis, EHSC: Enfermedad hepática sin cirrosis, ND: No disponible * *S. aureus* es motivo recibir antibioterapia previa, ND: no disponible, BGNF: bacilos Gram negativos no fermentadores

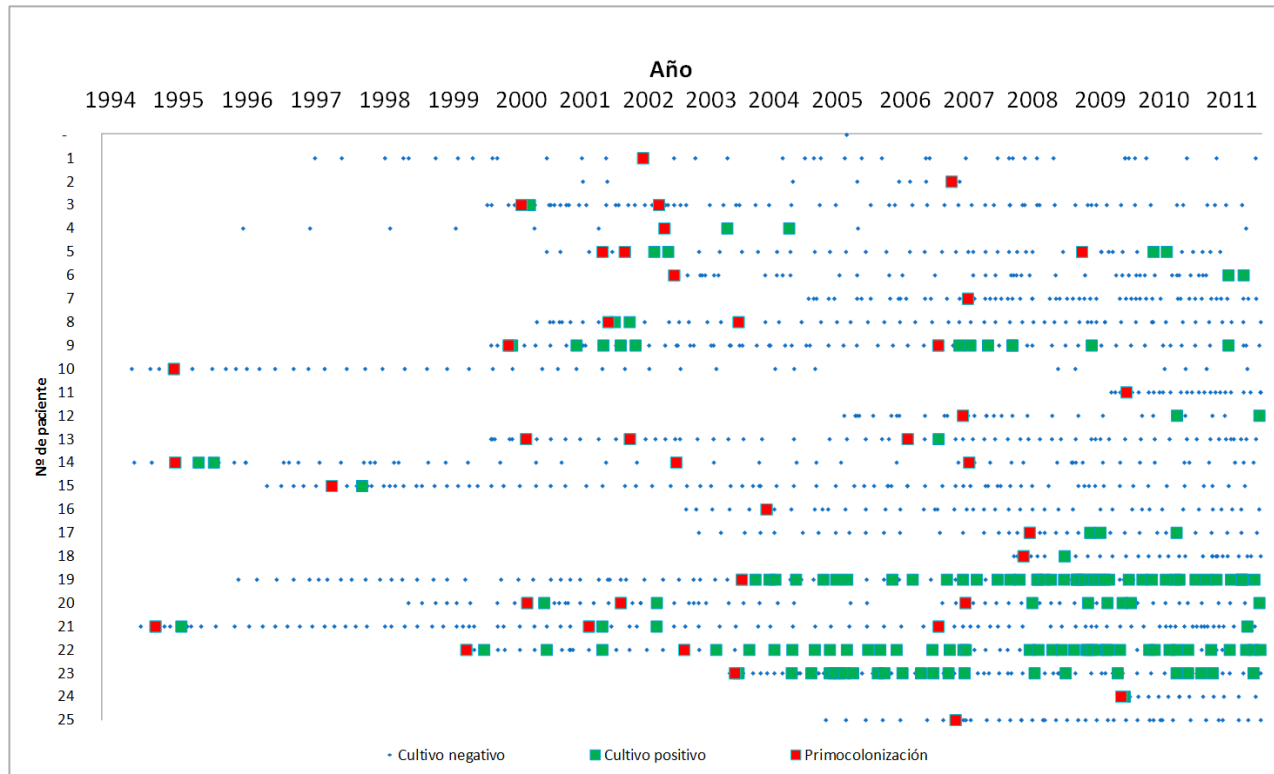


Figura 24. Cronograma de muestras analizadas, resaltando las positivas para *P. aeruginosa*.

2.2 Características microbiológicas

De los 25 pacientes con primocolonización detectados durante el periodo de 1994 a 2011 se analizaron un total de 1.264 muestras respiratorias, siendo 212 de ellas (17%) positivas para *P. aeruginosa* y recuperando un total de 196 aislados (23% de primocolonización, 39% de colonización intermitente y 38% de colonización crónica). En la [Tabla 7](#) se detallan los aislados de cada paciente con sus características.

Al analizar la figura 24 podemos observar entre los años 2000 y 2007 detectamos 4 casos de primocolonización, aunque la mayor prevalencia de *P. aeruginosa* se correspondió con el año 2002, aislando este patógeno en 11 de los 25 pacientes.

Los morfotipo de los aislados de todos los aislados frente a los aislados de primocolonización fueron: rugoso 40 vs 48%, mucoso 29 vs 9%, enterobacteriaceo 15 vs 17%, puntiforme 10 vs 11% y metálico 6 vs 15%. En la fase de colonización/infección intermitente, la cuarta parte de los aislados presentaban fenotipo mucoso, mientras que en la fase crónica este porcentaje ascendió 47 %.

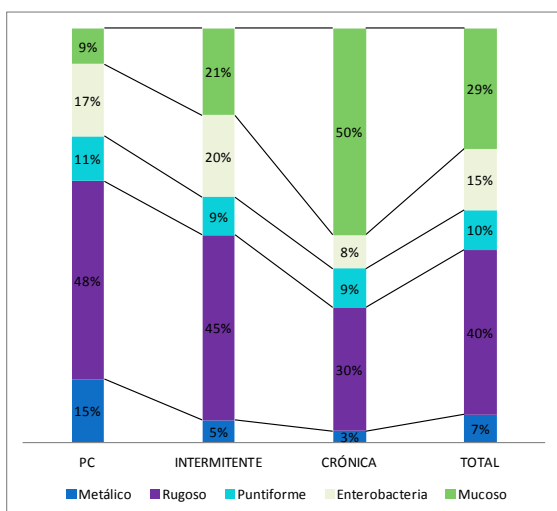


Figura 25. Prevalencia de los morfotipos de *P. aeruginosa* según el tipo de colonización pulmonar.

Los recuentos de *P. aeruginosa* en las muestras respiratorias oscilaron en un rango de 10 a 10^6 UFC/ml y como valor medio fue $7,4 \times 10^4$ UFC/ml. El recuento en el primer aislamiento de *P. aeruginosa* en los casos en los que únicamente había un aislado no era significativamente diferente, ya que la media fue de $2,4 \times 10^4$ UFC/ml.

2.2.1 *P. aeruginosa* y co-colonización

En cuanto a la coexistencia de *P. aeruginosa* con otros microorganismos la situación más frecuente fue el aislamiento de *S. aureus* (13 pacientes, 52%), seguido de *H. influenzae* (10 pacientes, 40%) (Tabla 6).

Tabla 6 . Resumen de co-colonización con otros microorganismos

			<i>Haemophilus influenzae.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae.</i>	<i>Staphylococcus aureus.</i>	<i>Achromobacter xylosoxidans.</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia.</i>
Nº DE AISLADOS	TOTAL		14	5	32	2	7
	POR FASE DE COLONIZACIÓN:	PC	9	2	13	0	1
		Intermitente	2	1	12	1	3
		Crónica	1	0	5	1	1
PACIENTES	Nº		10	3	13	2	2
	%		40%	12%	52%	8%	20%

Tabla 7 . Características de las cepas de primocolonización de *P. aeruginosa* de los 25 pacientes. Parte 1.

Paciente	Nº cepas total	Año	Nº cepas/año	Morfotipo
1	3	2002	3	m, r, muc
2	1	2007	1	muc
3	2	2000	1	e
		2002	1	e
4	6	2002	3	e, p, muc
		2003	1	r
		2004	2	e, r
5	5	2001	1	r
		2002	3	r (3)
		2009	1	r
6	1	2002	1	r
7	1	2007	1	r
8	3	2001	2	r, p
		2003	1	r
9	15	2000	2	m, r
		2001	2	r (2)
		2002	2	r, muc
		2006	2	e, r
		2007	3	muc (3)
		2008	2	r, muc
		2009	2	muc (2)
10	1	1995	1	p
11	1	2009	1	r
12	1	2007	1	p
13	5	2000	1	r
		2002	1	m
		2006	3	e, r (2)
14	3	1995	1	e
		2002	1	muc
		2007	1	m
15	2	1997	1	r
		1998	1	r
16	1	2004	1	r
17	4	2008	1	r
		2008	3	p, e (2)
18	2	2008	2	r (2)

Tabla 7. Características de las cepas de primocolonización de *P. aeruginosa* de los 25 pacientes. Parte 2.

Paciente	Nº cepas total	Año	Nº cepas/año	Morfotipo
19	51	2003	1	r
		2004	3	e, p, muc
		2005	5	e, r (2), muc (2)
		2006	5	m, r, p, muc (2)
		2007	6	m, r (2), muc (3)
		2008	13	e, r (2), p, muc (9)
		2009	18	i, r (4), p (2), muc (1)
20	8	2000	1	e
		2002	1	r
		2007	1	r
		2008	1	r
		2009	4	e (3), r
21	7	1994	1	p
		1995	2	e, p
		2001	2	m, r
		2002	1	m
		2006	1	r
22	47	1999	2	m, r
		2000	1	r
		2001	1	r
		2003	2	e, r
		2004	5	r (2), p, muc (2)
		2005	8	e (2), r (5), p
		2006	8	e (2), r (5), muc
		2007	4	e (2), muc (2)
		2008	5	e, muc (4)
		2009	11	r (2), p (2), muc (7)
23	23	2003	2	r
		2004	4	e (3), r
		2005	5	e, r (4)
		2006	6	e, r (3), p, muc
		2007	3	m, r, muc
		2008	2	e, p
		2009	1	p
24	2	2009	2	m
25	1	2007	1	r

2.3 Sensibilidad antimicrobiana

2.3.1 Estudios de sensibilidad antibiótica planctónica

Los resultados de sensibilidad (valores de CMI utilizando un inóculo planctónico) a los antimicrobianos empleados en FQ con mayor frecuencia de los 196 aislados de *P. aeruginosa* de los 25 pacientes estudiados desde 1994 a 2009 se reflejan en la Figura 26, clasificados por la fase de colonización en el momento de su aislamiento.

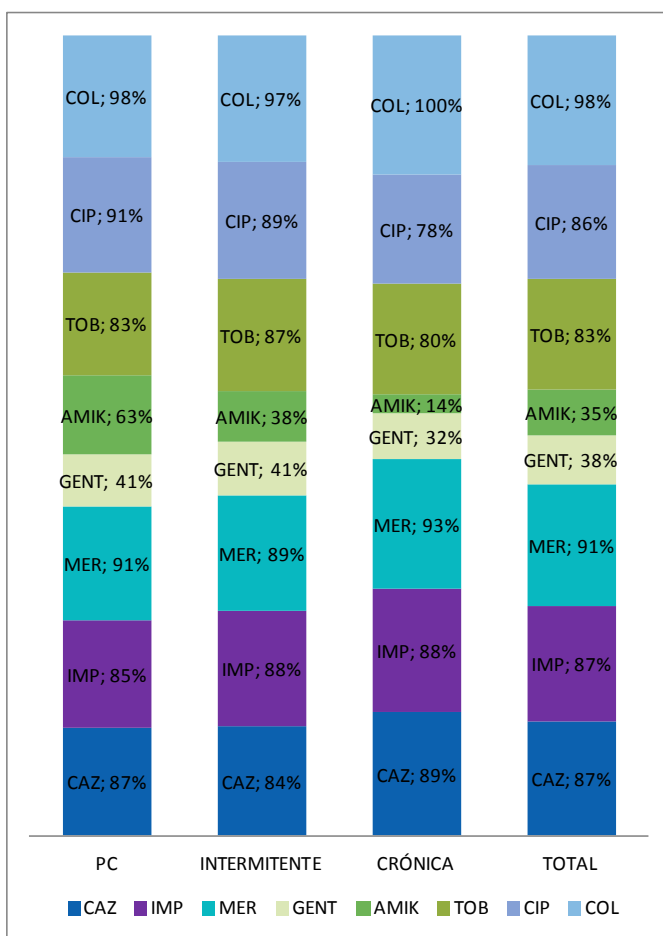


Figura 26. Resultados de sensibilidad a los antimicrobianos

Influencia del morfotipo en los valores de CMI

En la Figura 27 y Figura 28 se representan los porcentajes de resistencia a los diferentes antimicrobianos estudiados en las distintas poblaciones de *P. aeruginosa* según el morfotipo.

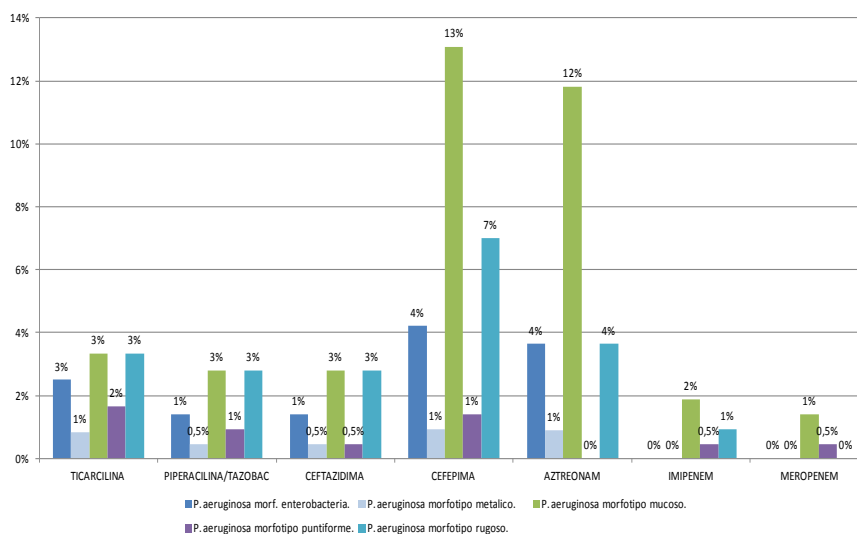


Figura 27. Porcentajes de resistencia a betalactámicos por morfotipo.

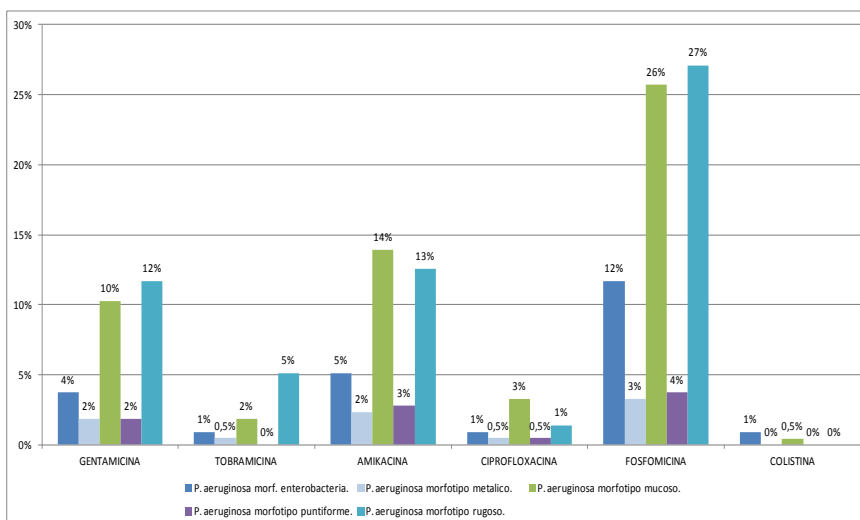


Figura 28. Porcentajes de resistencia a no betalactámicos por morfotipo.

Como se aprecia en las figuras, las cepas de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso presentaron un patrón de resistencia a los betalactámicos superior al de los otros morfotipos, seguido por las cepas con morfotipo rugoso. Estas últimas son las que muestran porcentajes de resistencia superiores a gentamicina, tobramicina y fosfomicina.

Multirresistencia

Se detectó un bajo porcentaje de multirresistencia: 33 aislados de un total de 212 (15,5%). Estos aislados multirresistentes provenían de 11 pacientes. Exceptuando el caso del Paciente 6, en el resto no se erradicaron los aislados multirresistentes a pesar del tratamiento. La distribución del morfotipo en los 33 aislados multirresistentes fue mucoso 37%, seguido por rugoso 33%, enterobacteria 18%, metálico 9% y puntiforme 3%.

Si tenemos en cuenta únicamente las cepas aisladas en fase de colonización crónica, hay que destacar al Paciente 22 con 14 aislados multirresistentes. Estos aislados se obtuvieron simultáneamente con aislados sensibles. En este paciente, el 64% de sus cepas multirresistentes presentaron morfotipo mucoso.

2.3.2 Sensibilidad antibiótica en biopelícula

Los resultados de sensibilidad antimicrobiana de los 46 aislados de primocolonización utilizando un inóculo de crecimiento en biopelículas se muestran en la [Tabla 8](#). Los valores más bajos de todas las concentraciones han sido la concentración preventiva de la formación de la biopelícula (CPBs) (media geométrica) de ciprofloxacino (0,5 mg/L), levofloxacino (0,9 mg/L), tobramicina (1,7 mg/L) y colistina (2,1 mg/L). Por el contrario, las concentraciones con valores más elevados pertenecen a los betalactámicos antipseudomónicos, en concreto a las concentraciones CBBs de imipenem (231,9 mg/L) y ceftazidima (1024 mg/L). Debido a su teórica baja actividad bactericida frente a *P. aeruginosa*, azitromicina también presenta valores muy altos de CBB (346,7 mg/L).

Tabla 8. Concentración preventiva, inhibitoria y bactericida en biopelícula.

ANTIMICROBIANO	CONCENTRACIÓN (mg/L)				% Cepas Sensibles (*)
	Rango	Valor 50	Valor 90	Media geométrica	
LEVOFLOXACINO					
CMI	0,25-2	1	1	0,5	83%
CMB	0,25-8	1	2	1,1	NA
CPB	0,25-64	1	4	0,9	42%
CIB	0,5-64	4	8	4,2	8%
CBB	2->64	64	128	53,2	NA
CIPROFLOXACINO					
CMI	0,06-2	1	1	0,3	91%
CMB	0,06-2	1	2	1,3	NA
CPB	0,12-8	1	4	0,5	66%
CIB	0,25-32	1	8	2,2	10%
CBB	2->128	64	128	50,0	NA
CEFTAZIDIMA					
CMI	0,5-32	2	16	2,9	87%
CMB	0,5-128	4	128	22,5	NA
CPB	1-512	16	512	18,5	48%
CIB	2-1024	128	512	49,6	30%
CBB	1024->1024	1.024	1.024	1.024,0	NA
IMIPENEM					
CMI	0,5-32	2	8	1,8	85%
CMB	0,5-128	4	32	10,4	NA
CPB	4-128	32	128	26,0	10%
CIB	16-256	64	256	47,4	0%
CBB	128-256	256	256	231,9	NA
TOBRAMICINA					
CMI	1-16	2	8	1,9	83%
CMB	2-32	4	16	6,3	NA
CPB	0,25-32	2	8	1,7	83%
CIB	0,5-128	8	16	9,0	30%
CBB	16->256	64	256	79,4	NA
COLISTINA					
CMI	1-8	2	4	1,8	98%
CMB	0,5-128	1	4	13,0	NA
CPB	0,25-32	2	4	2,1	63%
CIB	2-64	16	64	20,2	3%
CBB	8->128	64	128	64,0	NA
AZITROMICINA					
CMI	32-128	128	128	87,1	17%
CMB	>128	> 128	> 128	> 128	NA
CPB	1-256	8	128	4,7	82%
CIB	1-256	16	64	9,8	86%
CBB	128-512	512	512	346,7	NA

(*)NA: no aplicable. CMI: concentración mínima inhibitoria en crecimiento planctónico; CPB: concentración preventiva de biopelícula; CIB: concentración inhibitoria de biopelícula; CBB: concentración bactericida de biopelícula.

Los betalactámicos presentaron los mayores porcentajes de resistencia en crecimiento en biopelícula seguidos de colistina, a diferencia de su actividad en crecimiento planctónico.

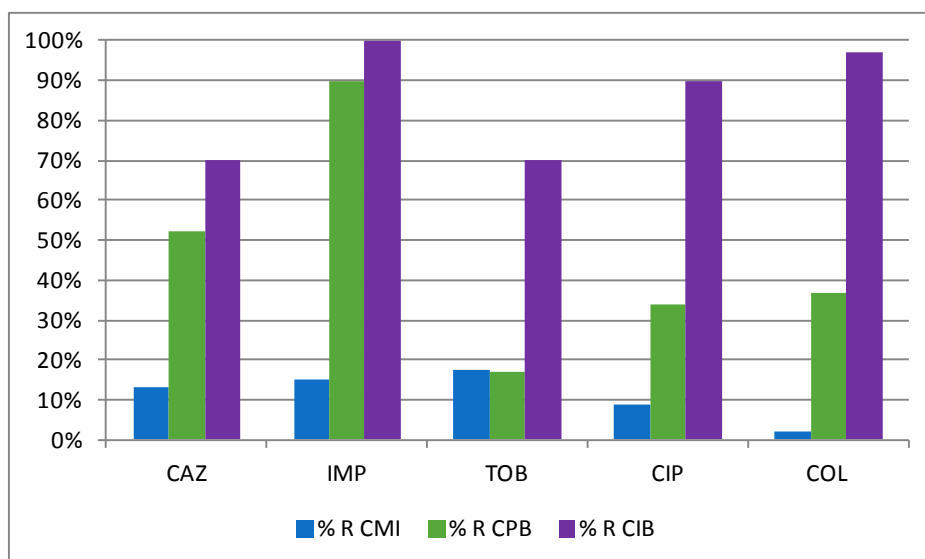


Figura 29. Porcentajes de resistencia en crecimiento planctónico y en biopelícula

Para cada antimicrobiano se presentan en la [Tabla 9](#) la relación entre los valores de la media geométrica de la sensibilidad en biopelícula respecto a sensibilidad estándar y las relaciones entre las dos concentraciones de sensibilidad para la biopelícula de inhibición y prevención. Coincidiendo con las expectativas, los antimicrobianos con una cinética rápida de muerte como fluoroquinolonas, aminoglucósidos y colistina presentaron valores de CPB s idénticos o ligeramente superiores a los valores de CMIs, con ratios CPB /CMI que comprenden desde 0,9 para tobramicina a 1,8 en el caso de ciprofloxacino. Por el contrario, los antimicrobianos betalactámicos presentaron ratios CPB/CMI elevados, concretamente 6,4 para ceftazidima y 14,3 para imipenem.

Tabla 9. Relaciones entre los valores de sensibilidad en biopelícula.

ANTIMICROBIANO	CPB/ CMI	CIB/ CMI	CIB/ CPB
LEVOFLOXACINO	1,8	8,4	4,7
CIPROFLOXACINO	1,7	7,3	4,2
CEFTAZIDIMA	6,4	17,1	2,7
IMIPENEM	14,3	26,0	1,8
TOBRAMICINA	0,9	4,8	5,3
COLISTINA	1,2	11,4	9,4
AZITROMICINA	0,1	0,1	2,1

Influencia del morfotipo en los valores de CIB y CPB

Al estudiar detalladamente los valores (media geométrica) de la sensibilidad en crecimiento en biopelícula CPB y CIB en función del morfotipo de la cepa, se observa que existen diferencias para cada antimicrobiano. Las cepas de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso presentaron los valores más altos de CIB y CPB para ambas fluoroquinolonas (levofloxacino y ciprofloxacino) y para colistina. De manera contraria, para ceftazidima e imipenem destacan las cepas con morfotipo puntiforme por presentar CIB mayores. Antimicrobianos tan diferentes como tobramicina y azitromicina en los aislados con morfotipo enterobactereaceo presentaron valores de CIB muy superiores al del resto de morfotipos.

2.4 Determinación de la frecuencia de mutación

Se determinó la frecuencia de mutación de 69 aislados de 24 pacientes seleccionados en fase de primocolonización (36 aislados), colonización intermitente (25 aislados) y colonización crónica (8 aislados). El rango de la frecuencia de mutación a rifampicina hallado en nuestro estudio fue de $1,3 \times 10^{-9}$ a $1,0 \times 10^{-7}$ (media: $2,1 \times 10^{-8}$), correspondiendo 49 aislados a la categoría de normomutadores (71%), 10 aislados fueron hipomutadores (14%), otros 10 aislados débilmente mutadores (14%), y ninguna cepa hipermutadora (Figura 30).

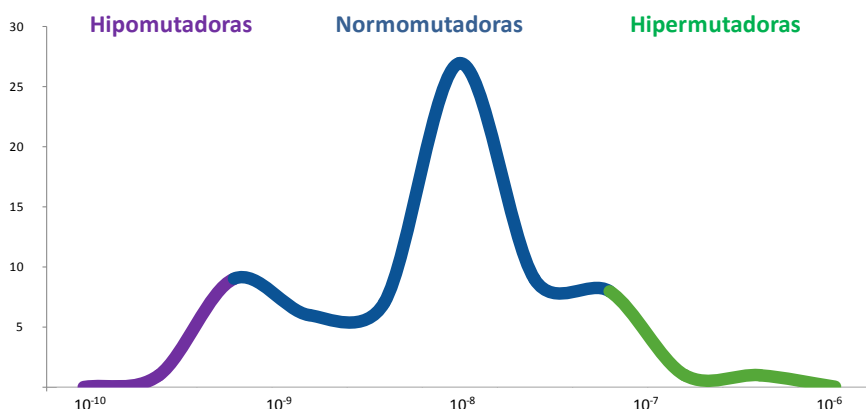


Figura 30. Distribución en tres zonas de las frecuencias de mutación de los aislados estudiados.

Como se evidencia en la Figura 30, la frecuencia de mutación sigue una distribución con tres zonas diferenciadas: zona de normomutación (5×10^{-9} – 5×10^{-8}) que agrupa a la mayor parte de las cepas, y los extremos con cepas hipomutadoras ($\sim 5 \times 10^{-9}$), y débilmente mutadoras ($\sim 5 \times 10^{-7}$).

Los aislados clasificados como hipomutadoras procedían de 7 pacientes diferentes: tres del Paciente 19, dos del Paciente 20 y cinco de pacientes distintos. Cinco de estas cepas que mostraron menores valores en la frecuencia de mutación se correspondían con el primer aislado de *P. aeruginosa* en el paciente, destacando que dos de estos pacientes

(Paciente 19 y Paciente 22) evolucionaron hacia la cronicidad. Las cepas que cronificaron durante más de cinco años eran hipomutadoras.

En el caso de las cepas normomutadoras, el 43% eran aislados de las fases de colonización intermitente o crónica pero los 49 aislados normomutadoras fueron aisladas de 17 pacientes a lo largo de todas las posibles fases de colonización/infección con *P. aeruginosa*: primocolonización (22 aislados), colonización intermitente (19 aislados) y todas las cepas de la fase crónica (8 aislados). Las cepas que permanecieron en el paciente durante menos de cinco años eran normomutadoras.

La mitad de las cepas débilmente mutadoras correspondían a aislados de primocolonización. En concreto, los 10 aislados débilmente mutadoras procedían de 8 pacientes y cinco de estas cepas fueron aisladas de la única muestra del paciente positiva para *P. aeruginosa* (Paciente 2, Paciente 11, Paciente 24 con dos cepas simultaneas y Paciente 25).

Cuando se analizaron los datos de frecuencia de mutación según el tipo de morfotipo al que correspondía la cepa, se observó una diferencia significativa entre los aislados rugosos con frecuencias más altas (más hipomutadores) y los aislados mucosos que tenían frecuencias significativamente más bajas (más hipermutadores).

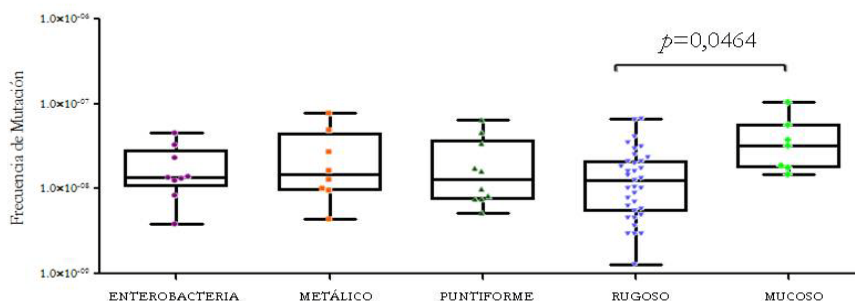


Figura 31. Distribución de las frecuencias de mutación según el morfotipo.

2.4.1 Estudio de hipermutación en *P. aeruginosa* de primocolonización

Cuando se analizó la frecuencia de mutación de los 36 aislados de *P. aeruginosa* de primocolonización se evidenció que 22/36 (61%) eran normomutadoras, 6/36 (17%) hipomutadoras, 8/36 (22%) débilmente mutadoras y no detectamos ningún aislado hipermutador. No se detectó ninguna diferencia significativa entre las frecuencias de mutación de los aislados de primocolonización y los de las restantes categorías.

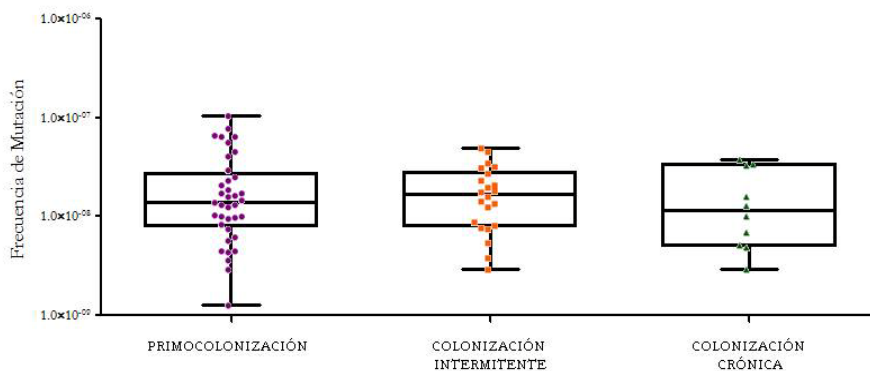


Figura 32. Distribución de la frecuencia de mutación según el momento de colonización/infección pulmonar.

El 30 % de los pacientes analizados tenían cepas débilmente mutadoras en la fase de primocolonización. En el momento del aislamiento inicial de *P. aeruginosa*, estos 7 pacientes tenían una edad superior (edad media de 10,2 años) a la que tenían aquellos pacientes con FQ de los que no se había recuperado ningún aislado hipermutador (edad media de 9,6 años). No se pudo establecer ninguna asociación entre el rango de frecuencia de mutación y los morfotipos (Figura 32), aunque las cepas hipomutadoras presentaban morfotipos rugoso y enterobacteria.

Del mismo modo, la clonalidad de los aislados fue excluida por técnicas de epidemiología molecular, donde se pudo evidenciar la existencia de tres sub-poblaciones distintas mutadora/no-mutadora en la misma muestra respiratoria de un paciente (Paciente 4) durante la fase de colonización inicial, con distinto morfotipo.

2.4.2 Evolución de la frecuencia de mutación en el mismo paciente

Mediante el análisis de las frecuencias de mutación de 28 cepas aisladas de 3 pacientes a lo largo del seguimiento (10 aislados del Paciente 19, 9 aislados del Paciente 22 y 9 aislados del Paciente 23) se pueden apreciar varios comportamientos en cuanto a la frecuencia de mutación de *P. aeruginosa* y el tiempo de evolución según se trate de un aislado de primocolonización, de colonización intermitente o de colonización crónica. Es importante resaltar que las cepas iniciales de los tres pacientes fueron hipomutadoras.

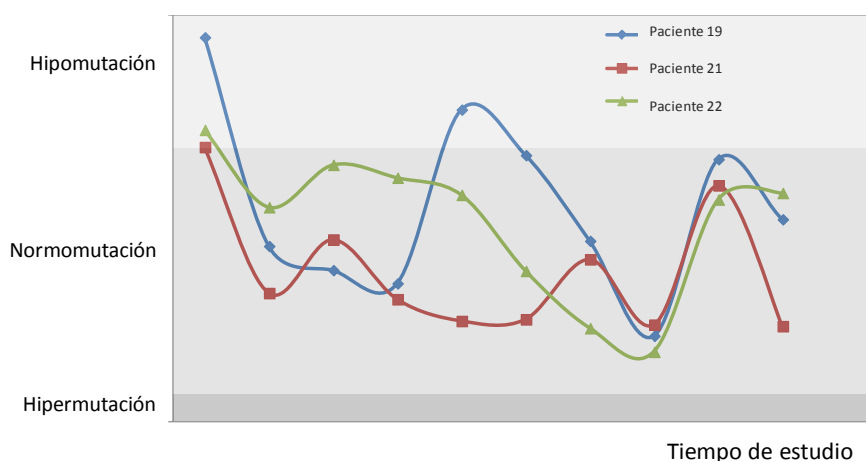


Figura 33. Evolución de la frecuencia de mutación en los aislados de los Pacientes 19, 21 y 22.

Otro análisis interesante es la comparación de las frecuencias de mutación de cepas aisladas de dos pacientes con varios episodios de primocolonización y con colonización intermitente sin llegar a cronificar (5 aislados del Paciente 20 y 5 aislados del Paciente 21). En el caso del Paciente 20, los tres primeros aislados son de primocolonización en distintos años y todos normomutadores. Durante la fase intermitente aparece algunos años el aislado hipomutador con el mismo perfil de PFGE. En el Paciente 21 las cepas de primocolonización eran normomutadoras, y posteriormente se aisló una cepa débilmente

mutadora con distinto perfil de PFGE, lo que sugiere que es un nuevo aislado.

2.5 Electroforesis de Campo Pulsado (PFGE)

2.5.1 Cepas de primocolonización

Una vez realizada la técnica de electroforesis en campo pulsado (PFGE) a las 25 primeras *P. aeruginosa* aisladas de 25 pacientes se detectaron un total de 24 pulsotipos distintos siendo los aislados del Paciente 16 y Paciente 25 los que compartieron el mismo patrón de bandas.

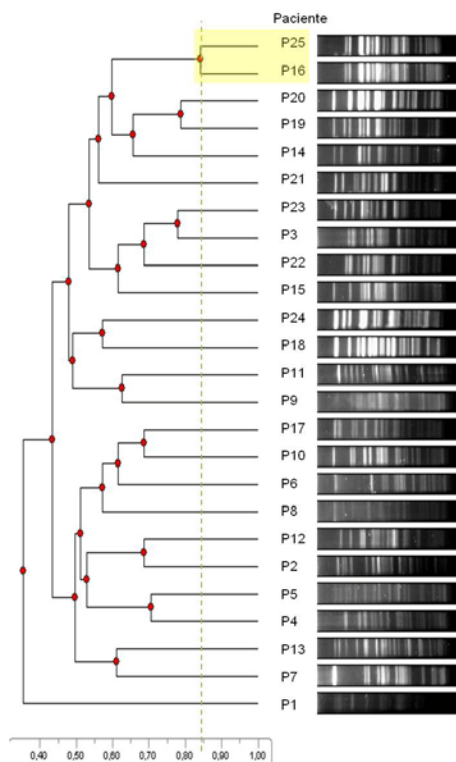


Figura 34. Dendrograma PFGE de las 25 primeras *P. aeruginosa*.

Resaltan en amarillo los aislados de los pacientes 16 y 25 con el mismo pulsotipo

2.5.2 Resultados de PFGE de las cepas de primocolonización y seguimiento

Pacientes con varias cepas de primocolonización

En los aislados de primocolonización de 3 pacientes diferentes (Pacientes 3, Paciente 8 y Paciente 14) se pudo comprobar que todos ellos presentan un patrón de PFGE distinto, con excepción dos cepas de *P. aeruginosa* aisladas simultáneamente en una muestra del Paciente 8.

Pacientes con un único pulsotipo PFGE en todas sus cepas

En 7 de los 25 pacientes se observó un único pulsotipo. Las cepas de cuatro pacientes (Paciente 15, 17 18 y 24) aisladas en fechas muy próximas entre sí, mostraron el mismo pulsotipo de PFGE una con la otra intra-paciente. De igual manera, todos los aislados de los Pacientes 5 y 20 comparten un pulsotipo idéntico intra-paciente a pesar de que se trataba de aislados recuperados a lo largo de 10 años.

Pacientes con varios PFGE en las cepas de colonización no crónica

Los pacientes 4, 9, 13 y 23 en fase de colonización inicial o intermitente, presentaron aislados de *P. aeruginosa* con pulsotipos iguales para cada paciente pero distintos entre ellos. Adicionalmente, algunos aislados de los pacientes 4 y 9 mostraron pulsotipos ligeramente distintos entre sí, hasta 4 subtipos diferentes para cada uno de los pacientes (de P4-B1 a P4-B4 y de P9-B1 a P9-B4). No se encontraron pulsotipos comunes en varios pacientes.

Pacientes con colonización crónica por *P. aeruginosa*

Los tres pacientes del estudio (Paciente 19, 22 y 23) que tenían aislados tanto de primocolonización como de fase de colonización intermitente y crónica presentaron pulsotipos relacionados intra-paciente. Algunos de los aislados muestran un perfil de PFGE constante y otros con variaciones a lo largo de los años.

Tabla 10. Resumen de pulsotipos PFGE

PACIENTE / AÑO	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
1									P1							
2														P2		
3							P3-A		P3-B							
4									P4-A-B1-B2	P4-B3-B4						
5								P5	P5							P5
6									P6							
7														P7		
8								P8-A		P8-B						
9							P9-A	P9-A	P9-A				P9-B1-B2	P9-B3-B4-C	P9-D-E	P9-F-G
10	P10															
11																P11
12														P12		
13							P13-A		P13-B				P13-C-D-E			
14	P14-A								P14-B					P14-C		
15			P15	P15												
16											P16-25					
17															P17	P17
18															P18	
19										P19-A1	P19-A1	P19-A1	P19-A1	P19-A1-A2	P19-A1-A3	P19-A1-A4-A5-
20							P20		P20					P20	P20	P20
21	P21-A	P21-B						P21-C	P21-D				P21-E			
22						P22-A	P22-A	P22-B1		P22-B1-B2-B3	P22-B3-B4-B5-	P22-B5-B6	P22-B5-B6	P22-B5-B6	P22-B4-B5	P22-B4-B5
23										P23-A1-B	P23-A2-A3	P23-A2-A3	P23-A2-A3	P23-A2-A3	P23-A2-A3	P23-A3
24																P23-A3
25															P16-25	

Resaltan en amarillo los aislados de los pacientes 16 y 25 con el mismo pulsotipo

2.6 MLST (Multi Locus Sequence Typing)

Basándonos en el análisis de PFGE, seleccionamos 27 aislados de primocolonización de los 25 pacientes para ser analizados por MLST, identificando 24 STs diferentes. Algunos aislados comparten el mismo clon (Tabla 11):

ST-274: 3 aislados: Paciente 10 (año 1995), Paciente 15 (1997) y Paciente 3 (2000) con 3 pulsotipos PFGE (en Tabla 11 resaltado en verde)

ST-508: 2 aislados: Paciente 14 (año 1995) y Paciente 20 (2000) con distinto pulsotipo (en Tabla 11 resaltado en rosa)

ST-312: 2 aislados: Paciente 16 (año 2004) y Paciente 25 (2007) con idéntico pulsotipo PFGE (en Tabla 11 resaltado en amarillo)

Tabla 11. Resumen de ST de MLST

PACIENTE/ AÑO	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
1								170								
2														606		
3							274	270								
4								244, 635, 700								
5								236								
6								460								
7														485		
8								395		641						
9							486									
10		274														
11															592	
12														253		
13							179						107			
14		508						499						540		
15				274												
16											312					
17															656	
18															428	
19										258						
20							508									
21	507															
22						569		27								
23										252, 539						
24																836
25														312		

Para conocer la diversidad genética de las 33 cepas de primocolonización clasificadas en función de su persistencia y compararlas con otros aislados hallados en nuestra Unidad de FQ (Fernández-Olmos y cols., 2013) realizamos un análisis mediante goEBURST. En este análisis también incluimos los linajes epidémicos internacionales (clones holandeses ST406 y ST497, clon de Liverpool ST146 y Clon de Manchester ST148) y los clones mayoritarios detectados en infecciones nosocomiales en los hospitales españoles (ST111, ST175, ST235, ST274, ST395, ST532 y ST646) (Figura 35).

Como podemos ver en la figura, los clones ST274 y ST395 agrupan cepas tanto de primocolonización como de colonización crónica o de infección nosocomial. Sin embargo, la mayoría de las cepas de colonización crónica pertenecen a STs diferentes de las cepas de primocolonización. También cabe destacar que no hemos detectado ninguna cepa perteneciente a los linajes epidémicos, pero existe una relación genética considerable entre el clon holandés ST497 y ST17 que agrupa cepas de primocolonización y de colonización crónica.

A continuación realizamos un análisis filogenético de nuestros aislados, y para ello se concatenaron las secuencias nucleotídicas de los 7 alelos y se calcularon las distancias filogenéticas (Figura 36). El resultado fue que las cepas se agruparon en 4 clústeres filogenéticos distintos, y una cepa se separó del resto. No se pudo diferenciar ningún tipo de relación entre los aislados causantes de primocolonización y los de colonización crónica, ya que todos los aislados estaban repartidos por igual entre los 4 clústeres.

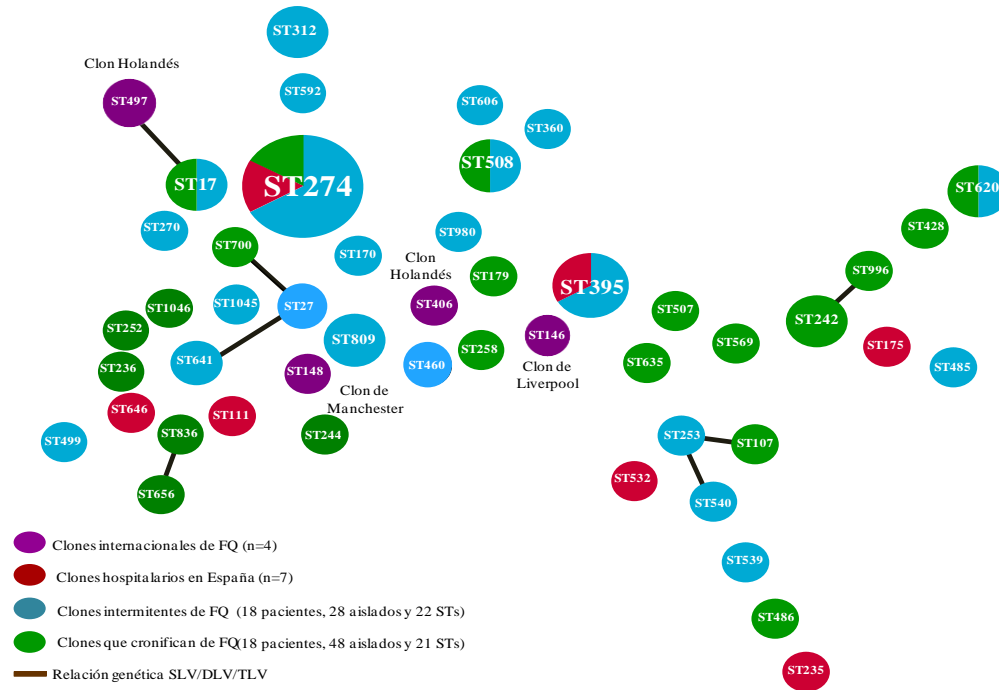


Figura 35. Minimum Spanning Tree de los aislados de *P. aeruginosa* esporádicos y crónicos en comparación con los clones aislados en los hospitales españoles y los grandes clones internacionales de FQ.

2.7 Rep-PCR DiversiLab

En primer lugar analizamos los primeros aislados de primocolonización de los 25 pacientes mediante DiversiLab, no detectando ninguna agrupación entre ellos.

En una segunda etapa analizamos aislados de primocolonización (n=14) y de colonización intermitente (n=5) de 5 pacientes diferentes (Pacientes 3, 8, 13, 14 y 21). El resultado fue que mediante esta técnica todas fueron clasificadas como diferentes, incluso cepas que además de compartir el mismo PFGE habían sido aisladas a la vez (Figura 38).

Finalmente analizamos mediante esta técnica los aislados de seguimiento, observando que en 15 cepas de un mismo paciente que tenían un PFGE *constante* solo dos compartían el mismo patrón de DiversiLab y otras dos estaban relacionadas compartiendo grupo. Este problema se repitió en el resto de pacientes, asignando 31 patrones de DiversiLab para los 41 aislados de 5 pacientes (Paciente 4, 9, 19, 22 y 23).

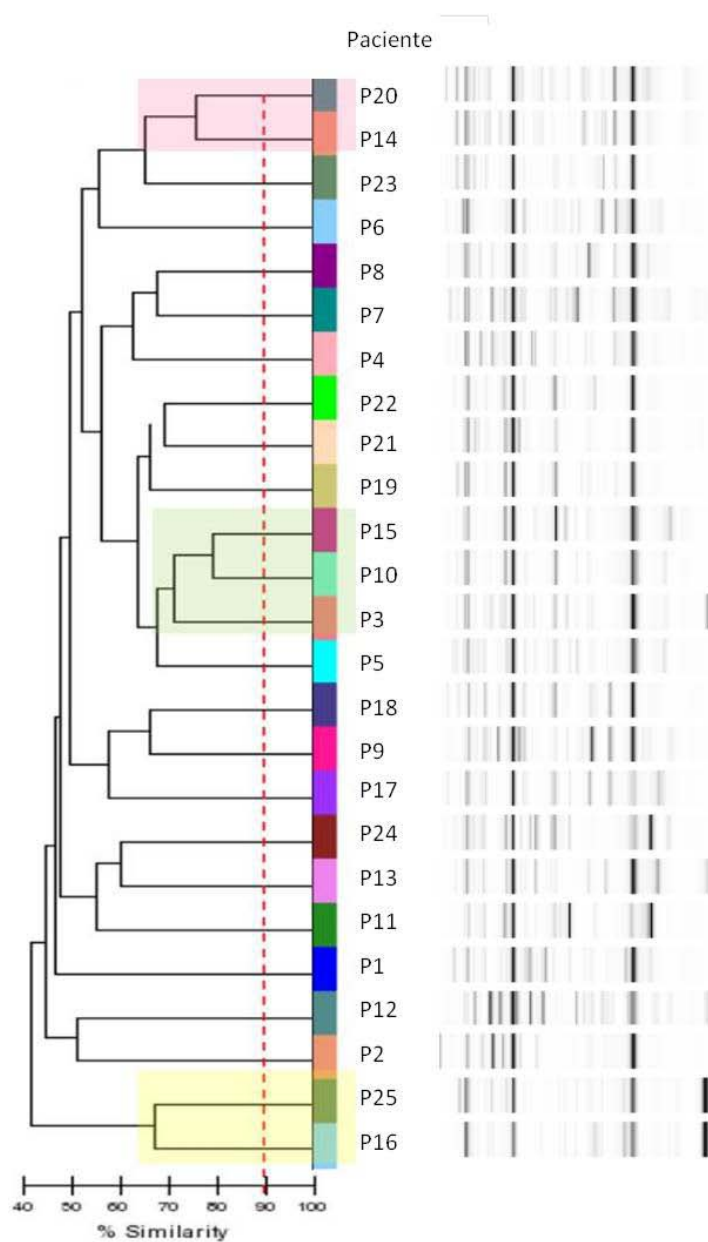


Figura 37. Dendrograma DiversiLab de 25 primeras *P. aeruginosa*

Resaltan en color los aislados con mismo ST aunque distinto patrón de DiversiLab

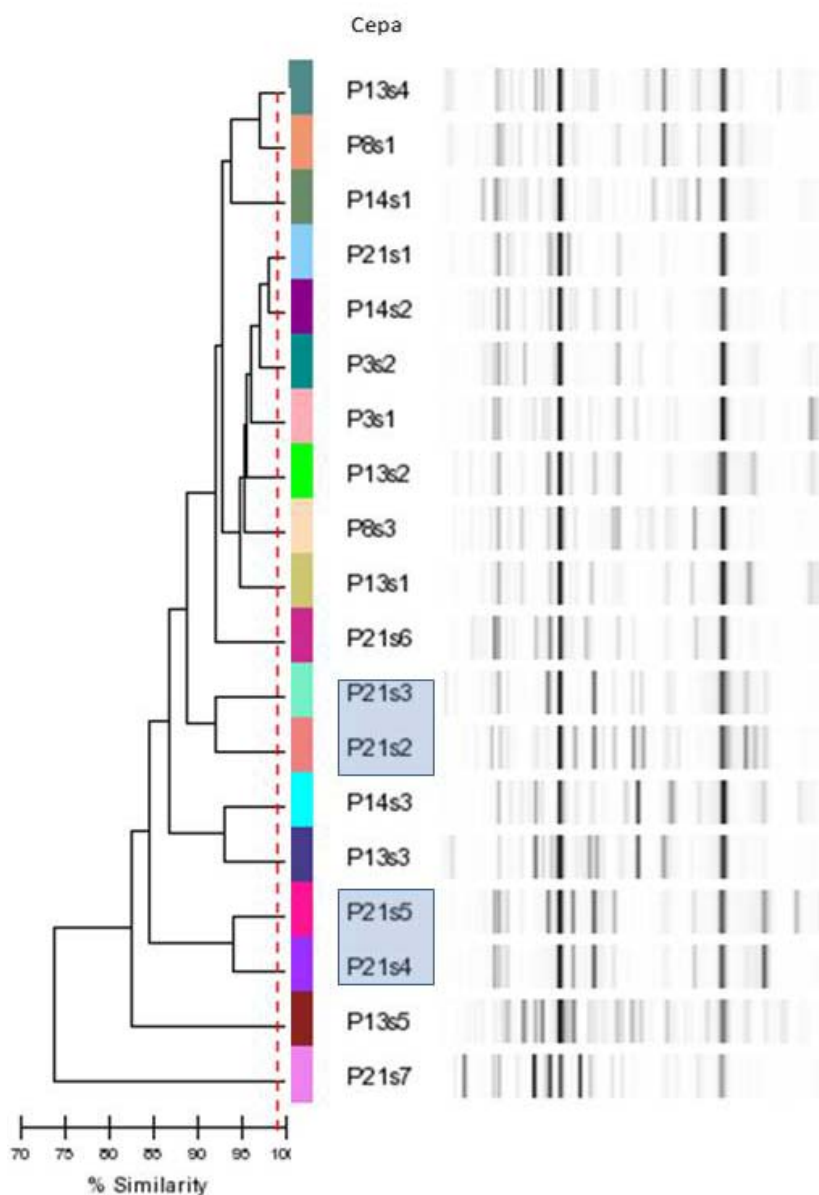


Figura 38. Dendrograma y matriz similitud DiversiLab de 19 cepas de *P. aeruginosa* de primocolonización y de colonización intermitente.

Resaltan en color los aislados simultaneos aunque con distinto patrón de DiversiLab

2.8 Espectrometría de masas MALDI-TOF

En primer lugar, se obtuvieron resultados fiables en la identificación de *P. aeruginosa* aisladas de muestras respiratorias de pacientes con FQ al emplear los espectros obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y procesados por el MALDI Biotyper. Se pudo realizar esta identificación directamente de la colonia sin método de extracción previo, con independencia de su morfotipo incluyendo cultivos de *P. aeruginosa* mucosos o puntiformes (SCV). Es importante esta capacidad de la técnica ya que estas variantes pueden presentar baja actividad bioquímica y dificultades para crecer en algunos medios de cultivos impidiendo su identificación mediante los métodos fenotípicos habituales.

En segundo lugar, se comprobó mediante varios estudios de reproducibilidad que se agrupaban las replicas mediante un dendrograma generado por MALDI Biotyper, en función de la similitud de los espectros, aunque existía variabilidad entre ellos. Concretamente en las muestras analizadas únicamente entre el 40-70% de los picos aparecían en todos los espectros debido a la influencia en la reproducibilidad de las condiciones de lectura (pase fresco, medios de cultivo, reactivos de extracción, calibración del espectrómetro de masas, temperatura ambiental, etc.) que causan diferencias entre las replicas, sobre todo en picos con baja intensidad relativa (1- 13%).

Posteriormente, se analizó la clonalidad de los aislados mediante MALDI Biotyper, iniciando el estudio en las 25 cepas de primocolonización, donde la mayoría presentaban PFGE distintos. Los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 39, quedando todos los aislados diferenciados.

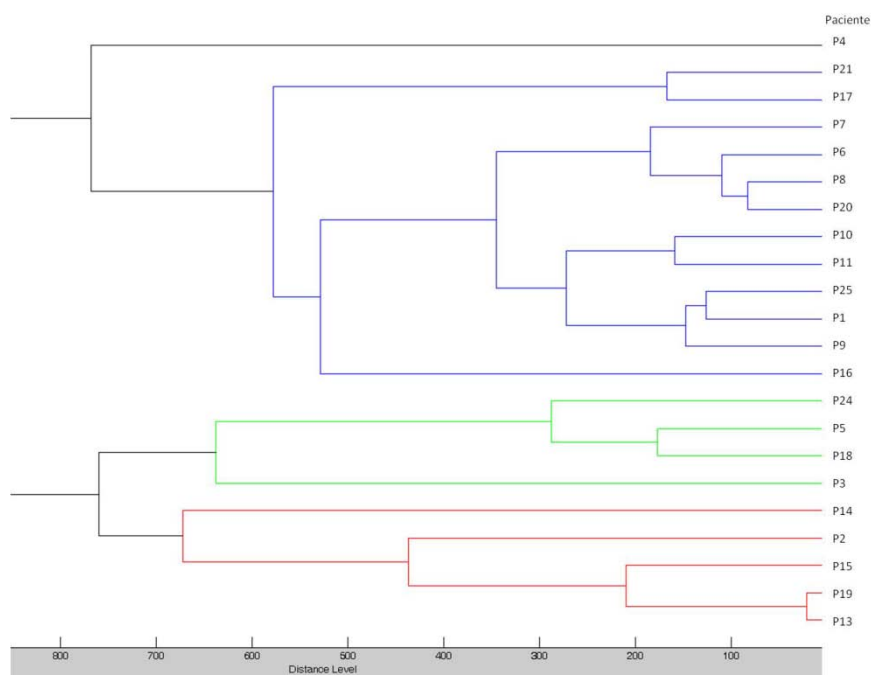


Figura 39. Dendrograma obtenido mediante MALDI Biotyper de las 25 cepas *P. aeruginosa* de primocolonización.

Por último, comparamos los aislamientos según cada paciente y su evolución en el tiempo, obteniendo resultados satisfactorios al agruparse juntos los aislados de cada paciente, como se muestra en la Figura 40 del Paciente 23 y sus aislados desde el 2003 al 2009, en el que se diferencia perfectamente una cepa con PFGE distinto.

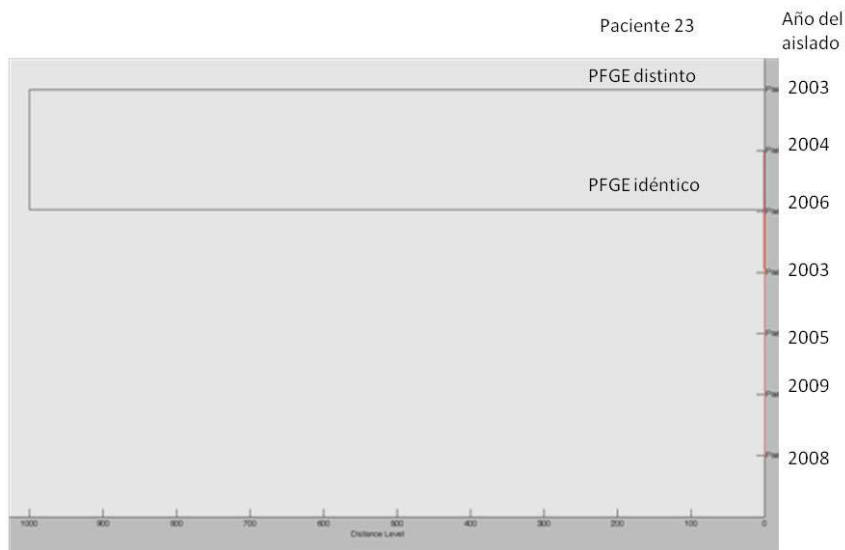


Figura 40. Dendrograma con cepas aisladas del Paciente 23

Este resultado no fue completamente reproducible al comparar con cepas de otros pacientes, ya que se mantuvieron únicamente agrupadas las cepas aisladas en el paciente en los años consecutivos 2004-2005-2006. Estas discrepancias pueden explicarse por motivos metodológicos en la adquisición de los espectros (obtenido el mismo día para esas 3 muestras), pero también puede existir una variabilidad biológica que el método de referencia por PFGE no haya sido capaz de discriminar.

En el Paciente 19 estudiamos 51 cepas aisladas entre 2003 y 2009, compartiendo el mismo PFGE 47 de ellas, y otras 4 presentaron variaciones. La agrupación por MALDI Biotyper en este caso no pudo diferenciar las cepas adecuadamente.

Por tanto, en nuestro análisis de clonalidad de las cepas tanto de primocolonización como de seguimiento destaca que a pesar de la gran facilidad de su creación y el potencial de esta tecnología, la morfología de los dendrogramas obtenidos no ha sido consistente.

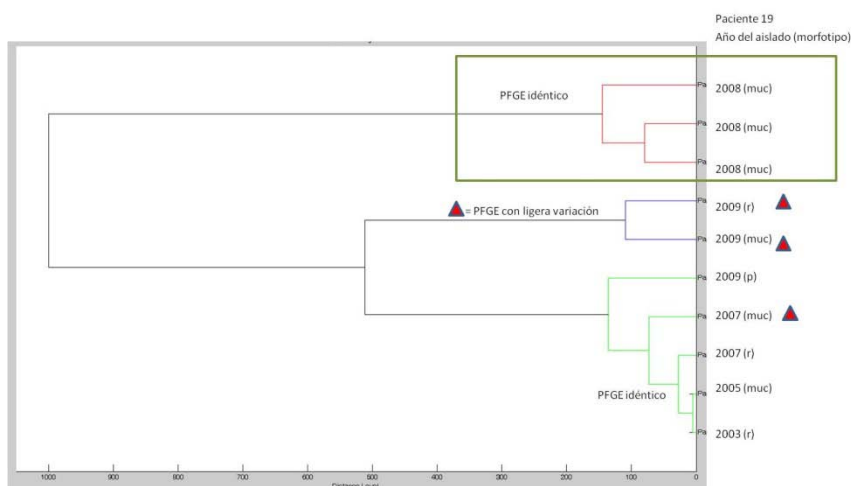


Figura 41. Dendrograma de cepas de seguimiento del Paciente 19.

Las cepas señaladas con un triángulo rojo representan variaciones en el PFGE.

2.9 Comparación PFGE y MLST

Se detectaron algunas discrepancias al comparar en profundidad los resultados del PFGE y del DiversiLab. Una de las discrepancias halladas consistió en que DiversiLab asignó patrones diferentes a las cepas que comparten un pulsotipo idéntico intra-paciente en el caso del Paciente 5 y del Paciente 20. En el Paciente 20 compartían pulsotipo PFGE idéntico los tres aislados de primocolonización (años 2000, 2002 y 2007) que indica no erradicación, mientras que mediante DiversiLab se les asignó 3 patrones diferentes como si se correspondiera con nuevas colonizaciones.

En nuestro estudio, las cepas aisladas en fechas muy próximas entre sí (Paciente 17 en 1 año y Paciente 24 en 1 mes) nos permitieron determinar la reproducibilidad del DiversiLab después de que los pacientes recibieran el mismo tratamiento erradicador (ciprofloxacino), obteniendo discrepancia de resultados por ambos métodos. La cepa de primocolonización y la cepa o cepas de la fase de colonización intermitente muestran el mismo pulsotipo de PFGE, para cada uno de los pacientes. Sin embargo, los dos aislados cercanos del Paciente 17 presentan patrones diferentes por DiversiLab, y los dos aislados del Paciente 24 quedan como dos patrones diferentes pero pertenecientes al

mismo grupo. Ya que los aislados comparten el mismo perfil de PFGE se podría afirmar que este resultado es concordante con su categorización como perteneciente a una fase intermitente y no sería el caso de una nueva colonización, infiriendo que el tratamiento erradicador no fue eficaz. Por su parte, los resultados del DiversiLab muestran una relación epidemiológica únicamente de los aislado cronológicamente muy cercanos del Paciente 24, que además ya presentaba diferencias.

También se contabilizaron 3 discrepancias porque asignó distinto patrón a aislados simultáneos en fase de primocolonización y otras 17 cuando asignó distinto patrón en fase de no-primocolonización, que implicó variaciones de clones en el seguimiento de 6 pacientes.

2.10 Comparación PFGE, MLST, DiversiLab y MALDI-TOF

Hemos detectado discrepancias en los resultados obtenidos con las cuatro técnicas que se han utilizado para el estudio de la epidemiología molecular de los aislados de *P. aeruginosa*.

En primer lugar cuando analizamos los resultados de las 25 primeras cepas de primocolonización de los pacientes, obtuvimos 25 patrones diferentes por DiversiLab y EM MALDI-TOF, mientras que con PFGE y MLST se identificaron 24 y 22 linajes, respectivamente.

Posteriormente comparamos también todas las cepas que habían sido categorizadas como primocolonización, detectando de nuevo algunas discrepancias. En general, la técnica de DiversiLab asigna diferencias a cepas que son iguales por PFGE, mientras que MLST suele reducir la diversidad genética de los aislados, agrupando las cepas en menor número de STs. En los aislados de no-primocolonización (en la fase intermitente y crónica) DiversiLab detectó las pequeñas diferencias existente entre los aislados. Los resultados de comparación de las cuatro técnicas se resumen en la [Tabla 12](#).

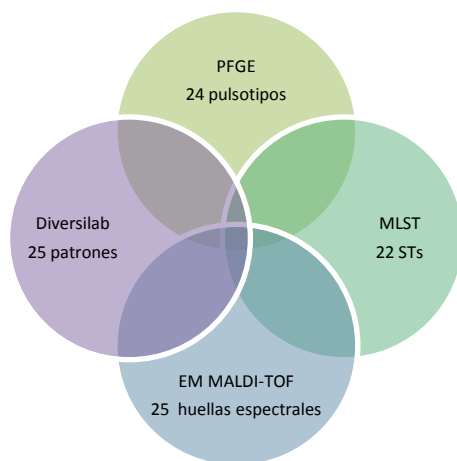


Figura 42. Resultados obtenidos mediante las cuatro técnicas en las 25 primeras cepas

Tabla 12. Comparación de los resultados obtenidos para cada técnica en las cepas de primocolonización y de colonización crónica.

	Nº aislados	Nº pulsotipos PFGE	Nº Subtipos PFGE	Nº patrones Diversilab	Estudiados por Diversilab	Nº patrones MLST	Estudiados por MLST	Nº espectros EM	Estudiados por EM
Primocolonización	46	36	4	42	42	30	33	25	25
No- Primocolonización	150	23	19	31	47	1	1	55	58

3. DETECCIÓN PRECOZ DE *P. aeruginosa*

Se han empleado técnicas de Microbiología Molecular, en concreto PCRs con cebadores específicos de genes dianas de *P. aeruginosa*, para estudiar la posibilidad de implantar una detección precoz de este microorganismo en muestras respiratorias de pacientes con cultivo negativo. Algunos ejemplos de los resultados de amplificación se muestran en la Figura 43. Amplicones de PCR en geles de agarosa. Mediante el patrón de peso molecular 100 bp ADN Ladder, se comprueba que el tamaño de cada banda es acorde al tamaño del amplicón esperado: 16SrADN (312 pb), *oprL* (504 pb) y *mucA* (623 pb).

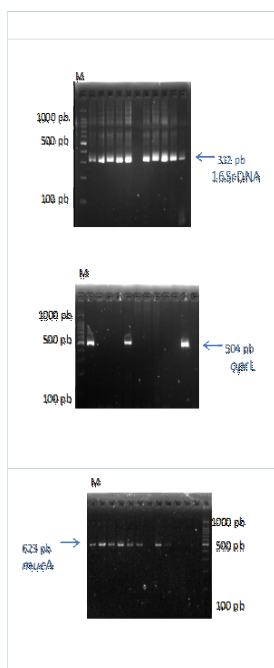


Figura 43. Amplicones de PCR en geles de agarosa

Se testó esta prueba en 311 muestras respiratorias de 34 pacientes seleccionados sin colonización crónica que fueron obtenidas en tres años de seguimiento. Los resultados obtenidos se resumen en la [Tabla 13](#).

Tabla 13. Resultados de cultivo vs PCR de *P. aeruginosa*

	C+ PCR +	C+ PCR d	C+ PCR -	C+ PCR nula	C- PCR-	C- PCR+	C- PCR d	C- PCR nula
16SrDNA	19	2	5	0	275	3	14	0
<i>oprL</i>	12	0	0	0	0	3	1	0
<i>mucA</i>	12	2	0	0	0	3	13	0
Total	12	2	5	1	275	3	14	5
Cultivo p +		0	1			3	9	
Cultivo p -/a +		0	0			0	2	

C (cultivo), d (discordante), p+ (posterior positivo), p-/a+ (posterior negativo y anterior positivo).

Tres muestras, de 3 de pacientes distintos, fueron negativas por cultivo pero positivas por ambas PCRs (*oprL* y *mucA*). Se aisló *P. aeruginosa* por cultivo en un paciente, de los tres pacientes con cultivo negativo/ PCR positiva por ambas PCRs, seis meses después de esa muestra discrepante (por primera y única vez) mientras que los otros dos pacientes presentaron colonización intermitente por *P. aeruginosa* previamente y posteriormente a la fecha de las muestras discrepantes.

Adicionalmente, catorce muestras obtenidas de 13 pacientes presentaron cultivo negativo pero PCR positiva mediante un único cebador, 13 por *mucA* y 1 mediante *oprL*. Podemos denominar a este resultado cultivo negativo/ PCR “discordante” porque el otro cebador empleado proporciona un resultado diferente. En el único paciente con *oprL* positivo (coincidente con uno de los dos pacientes que presentan C-/PCR+) y en uno de los 12 con *mucA* positivo (diferente a los dos pacientes con C-/PCR+) se detectó colonización intermitente por *P. aeruginosa* anterior y posteriormente a la fecha de la muestra discrepante.

Destaca que seis de los 12 pacientes con *mucaA* positivo obtuvieron un resultado de cultivo positivo para *P. aeruginosa* en un periodo medio de un año. En concreto, dos pacientes antes de un año (4 y 8 meses), dos pacientes al año y dos pacientes después del año (16 y 22 meses). También existe el caso de dos paciente con C-/PCR “discordante” cuyos aislados de *P. aeruginosa* por cultivo se registraron dos y cuatro años antes. Por el contrario, tres pacientes no presentaron cultivos positivos en el tiempo de duración de este estudio, ni tampoco en su seguimiento posterior hasta diciembre del 2011. En concreto, en esas tres muestras por cultivo se aislaron los mismos microorganismos (*S. aureus* y *H. parainfluenzae*). Cinco muestras con cultivo positivo de *P. aeruginosa* resultaron negativas por las dos PCRs específicas. También resultaron dos muestras con cultivo positivo y PCR “discordante” al tener solo *mucaA* positiva.

El recuento de *P. aeruginosa* en el cultivo de estas siete muestras, de 7 pacientes distintos, no supero las 10000 UFC/ml en ningún caso, siendo en dos muestras el recuento muy bajo, de 10 UFC/ml. En el seguimiento de estos pacientes en el tiempo de duración de este estudio, para cuatro de los 5 con resultado C+/PCR- y para los dos con C+/PCR “discordante” esta muestra fue la única en la que se aisló *P. aeruginosa*. El otro de los pacientes, presentó 4 posibilidades de resultados en estos años, que fueron: C+/PCR+ (n=1), C-/PCR- (n=8), C+/PCR- (n=1), C-/PCR+ (n=1).

En las muestras con resultados discrepantes para el cultivo y las PCRs, no se ha encontrado ninguna relación con la presencia de otras especies bacterianas aisladas de las muestras respiratorias y tampoco hay efecto de la cantidad de muestra.

No se obtuvieron resultados positivos en la PCR de 16SrADN en seis muestras. Se han denominado en la [Tabla 13](#) como resultados con PCR nula ya que esta reacción se ha empleado como control de la viabilidad de la muestra. Una muestra pertenecía al grupo de cultivo positivo para *P. aeruginosa* y las otras 5 a cultivo negativo, siendo incluso una muestra informada como estéril al no recuperarse ningún tipo de microorganismo.

Para evaluar la validez de estas PCR para *P. aeruginosa* como prueba diagnóstica se determinaron los índices de validez siguientes: Sensibilidad (Sen), Especificidad (Esp), Proporción de falsos positivos (PFP), Proporción de falsos negativos (PFN), Valor predictivo positivo (VPP) y Valor predictivo negativo (VPN). De esta forma se puede comprobar cuánto se aproxima el resultado de cada una de las PCR específicas al cultivo, considerando el cultivo como el método de referencia (“gold estándar”) y excluyendo las seis muestras con PCR de 16SrADN negativa. Para facilitar su determinación, para cada cebador por separado, los resultados se pueden expresar en unas tablas como las siguientes:

Tabla 14. Resultados para *oprL*

	CULTIVO -	CULTIVO +	Total
PCR (<i>oprL</i>) -	288	7	295
PCR (<i>oprL</i>) +	4	12	16
Total	292	19	311

Tabla 15. Resultados para *mucA*

	CULTIVO -	CULTIVO +	Total
PCR (<i>mucA</i>) -	276	5	281
PCR (<i>mucA</i>) +	16	14	30
Total	292	19	311

Tabla 16. Índices de validez

	PCR (<i>oprL</i>)	PCR (<i>mucA</i>)
Sen	63,2%	73,7%
Esp	98,6%	94,5%
PFP	1,4%	5,5%
PFN	36,8%	26,3%
VPP	75,0%	46,7%
VPN	¹³⁴ 97,6%	98,2%

En resumen, la PCR empleado el cebador *oprL* tiene una sensibilidad del 63,2 %, una especificidad del 98,6% mientras que la PCR mediante el cebador *mucA* presenta un valor de sensibilidad mayor (73,7%) pero con menor especificidad (94,5%). Existe una gran diferencia entre los VPP, siendo del 75,0% y 46,7% para *oprL* y *mucA*, respectivamente, resultando las diferencias menores entre el 97,6% y el 98,2% de los VPN.

Para profundizar en el carácter pronóstico de estas pruebas de PCR para la detección de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias, se reanalizaron los datos obtenidos considerando en esta ocasión la referencia empleada es la suma de los resultados del cultivo simultaneo y posteriores del paciente. Por ejemplo, se considera como “cultivo positivo” (y se denomina “C y Cp+”) aquellas muestras con resultado de cultivo positivo tanto en el realizado simultáneamente en la misma alícuota como en posteriores realizados al mismo paciente (anteriormente denominados “cultivo posterior positivo”). De esta forma, los resultados quedarían:

Tabla 17. Resultados pronósticos para oprL

	C y Cp -	C y Cp +	Total
PCR (<i>oprL</i>) -	288	7	295
PCR (<i>oprL</i>) +	0	16	16
Total	288	23	311

Tabla 18. Resultados pronósticos para mucA

	C y Cp -	C y Cp +	Total
PCR (<i>mucA</i>) -	276	5	281
PCR (<i>mucA</i>) +	5	25	30
Total	281	30	311

Tabla 19. Índices de validez pronósticos

	PCR (<i>oprL</i>)	PCR (<i>mucA</i>)
Sen	69,6%	83,3%
Esp	100,0%	98,2%
PFP	0,0%	1,8%
PFN	30,4%	16,7%
VPP	100,0%	83,3%
VPN	97,6%	98,2%



DISCUSIÓN

La principal motivación para la realización de esta Tesis Doctoral fue en primer lugar conocer la epidemiología de la colonización broncopulmonar en los pacientes con FQ, para después profundizar en el estudio y caracterización de las cepas de *P. aeruginosa* que se aíslan en la fase de primocolonización pulmonar, incluyendo el seguimiento microbiológico de los pacientes y su evolución. Para prevenir o posponer la colonización crónica surge la necesidad de unas técnicas de detección de la primocolonización rápidas y sensibles, como la detección de *P. aeruginosa* de muestras respiratorias por PCR.

Epidemiología de la colonización broncopulmonar

En el primer bloque de la Tesis, realizamos un análisis retrospectivo de la colonización/infección broncopulmonar en los pacientes atendidos en la Unidad de FQ del Hospital Ramón y Cajal desde 1993 a 2011, durante cuatro periodos de tiempo: Periodo A (1993-1995), Periodo B (2002-2003), Periodo C (2006-2007) y Periodo D (2010-2011). Uno de los resultados más importantes de este análisis fue que la edad media de supervivencia de los pacientes con FQ ha cambiado sustancialmente en los últimos 25 años, en concordancia con los datos del Registro Norteamericano que describe que se ha incrementado la media de edad de los pacientes pasando de los 30 años en 2002 a los 40 años en 2012 (CFF, 2012).

Este aumento en la supervivencia es debido, sin duda, a múltiples razones entre las que se incluyen los avances que se han conseguido en el diagnóstico precoz, el control en la terapia nutricional y digestiva unidos a las mejoras en el tratamiento antimicrobiano. Además, el desarrollo de Unidades multifuncionales y multidisciplinarias de FQ ha sido crucial. Actualmente el seguimiento de estos pacientes se lleva a cabo por gastroenterólogos, neumólogos, nutricionistas, fisioterapeutas, microbiólogos, radiólogos, psicólogos y trabajadores sociales especializados en esta disciplina (Salcedo, 1999).

Los pacientes de la Unidad de FQ del Periodo A (1993-1995), presentaron una media de edad de 16,9 años que se incrementó a 25,4

años en el Periodo B (2002-2003). Esta diferencia también puede ser atribuida a que la mayoría de los pacientes nuevos del periodo B eran adultos e incrementaron la media de edad.

Por otro lado, en el último periodo (Periodo D: 2010-2011) disminuyó la media de edad de los pacientes por la incorporación de pacientes nuevos de menor edad, en concreto 24 pacientes (17%) menores de 5 años, motivado en parte por la puesta en marcha de los programas de cribado neonatal en este último periodo.

El análisis de los datos microbiológicos de los pacientes atendidos en la Unidad ha demostrado que la distribución de las especies bacterianas fue similar en los cuatro periodos estudiados. Al igual que ocurre en otros países, *S. aureus* fue el microorganismo aislado con más frecuencia, seguido por *P. aeruginosa*.

En nuestra Unidad en el primer Periodo A (1993-1995) la prevalencia de *S. aureus* fue la más elevada (75%) y similar a los resultados obtenidos en un estudio de Argentina en el que se aisló en el 72 % de los pacientes (Busquets, y cols., 2013). Hemos registrado tasas de colonización/infección por *S. aureus* similares en los últimos tres periodos evaluados (B 58% - C 58% - D 64%) y en concordancia con los datos del Registro Norteamericano en 2012 (69%). A la vista de estos resultados, podemos decir que el empleo de suero salino hipertónico durante el Periodo D no parece haber influenciado la colonización por *S. aureus*.

S. aureus es el microorganismo predominante durante los primeros años de vida, llegando a aislarse hasta en el 80% de los niños con FQ de 6 a 17 años (CFF, 2012). En nuestro estudio, el rango etario en el que más frecuentemente se encuentra *S. aureus* abarca a los pacientes de 0 a 16 años en todos los periodos excepto en el Periodo B que esta desplazado a los menores de 11 años. Un estudio clásico realizado con muestras de frotis orofaríngeo de pacientes diagnosticados por cribado neonatal encontró un predominio de *S. aureus* en menores de 2 años, junto con *H. influenzae* (Abman y cols., 1991).

Se describe clásicamente como característica de los pacientes de menor edad la colonización por *H. influenzae* y *S. pneumoniae*. En consonancia y en términos generales, en nuestra Unidad se observó en todos los años estudiados una mayor presencia de estos microorganismos en los grupos etarios más bajos y su frecuencia de colonización/infección disminuyó según aumentó la edad del paciente.

Otros microorganismos que también se aislaron, sin un aumento significativo en su prevalencia a lo largo de los cuatro periodos (1993-2011), fueron: *H. influenzae* (promedio del 20%) seguido de *S. maltophilia* (promedio del 12%), *S. pneumoniae* (promedio del 8%), *B. cepacia* complex (promedio del 3%) y *Acinetobacter* spp (promedio del 2%). Este patrón de colonización fue similar en cuanto a las especies bacterianas aunque con distintos porcentajes al descrito en el estudio realizado en la Unidad de FQ del Hospital de Sabadell (1995-2009), en el cual los microorganismos prevalentes fueron *S. aureus* (40,8%), *P. aeruginosa* (19,4%), *B. cepacia* complex (16,7%), *H. influenzae* (3,3%), *S. maltophilia* (1,9%) y *A. xylosoxidans* (0,5%) (Asensio de la Cruz, y cols., 2012). En nuestro estudio, *A. xylosoxidans*, no estaba distribuido en todos los periodos, únicamente se aisló en el Periodo B (2%) y Periodo D (7%) y además, se produjo el aislamiento de *C. indologenes* únicamente en el periodo D (6%).

La identificación de microorganismos Gram negativos de las muestras respiratorias puede ser importante tanto para el paciente como para la Unidad de FQ, en especial de *B. cepacia*. Aunque la patogenicidad de muchos de estos microorganismos todavía no está bien establecido, la presencia de *S. maltophilia* suele relacionarse con exacerbación pulmonar (Cantón y cols., 2003) y *A. xylosoxidans* provoca infección persistente e inflamación (Hansen y cols., 2010)

La colonización por más de un microorganismo es de gran importancia desde el punto de vista ecológico y del mantenimiento o persistencia de las comunidades (Hoffman y cols., 2006). Oliver ha descrito que hasta en el 70% de los pacientes pueden coexistir diferentes microorganismos habituales en FQ y que en más del 50% se aíslan simultáneamente *P. aeruginosa* y *S. aureus* (Oliver, y cols., 2009). Estos

porcentajes son superiores a los encontrados en nuestra Unidad, ya que en los cuatro periodos la co-colonización de *P. aeruginosa* con *S. aureus* y no superó el 40%. También destaca la alta frecuencia de la co-colonización de *S. aureus* con *H. influenzae*, especialmente en el Periodo B (26%).

El estudio de la colonización bronquial por *P. aeruginosa* es básico en el seguimiento clínico de los pacientes con FQ. En el caso de *P. aeruginosa* nuestras cifras de prevalencia en los primeros tres periodos evaluados (A 69%- B 51% - C 45%) se sitúan en un valor medio muy similar a las publicadas para otros países europeos, como Italia con una tasa de colonización del 40% en 2002 (Lambiase y cols., 2006) y también comparable a su aislamiento en los pacientes incluidos en el Registro Norteamericano con una prevalencia del 58%, 57,8% y 49,6% en los años 1992, 2002 y 2012, respectivamente (CFF, 2012).

En el último periodo observamos que la tasa de colonización por *P. aeruginosa* descendió hasta valores del 35%. Esta cifra es similar a la descrita en estudios previamente realizados en España con tasas del 33% (García Hernández y cols., 2004) en pacientes con edad media de 15 años, y hasta un 70% de colonización por *P. aeruginosa* en pacientes con edad media de 23 años (De Gracia y cols., 2002). Esta progresiva disminución del aislamiento de *P. aeruginosa* podría atribuirse a varias causas como el tratamiento agresivo, precoz y persistente de la infección respiratoria con fines de erradicación y las ayudas para el aclaramiento de la secreciones bronquiales, como las fisioterápicas, así como sustancias como la enzima DNasa para purificarlas y el suero salino hipertónico. De forma adicional, se considera que la edad es uno de los factores más importante que influye en la colonización pulmonar por *P. aeruginosa* (García-Hernández y cols, 2004) y en este sentido en nuestra Unidad, como hemos comentado anteriormente, en este Periodo D la media de edad de los pacientes disminuyó por la incorporación de pacientes nuevos de menor edad.

El análisis de la evolución temporal de la colonización de los pacientes con FQ ha permitido definir el concepto de cronología de la infección en función de su edad. En nuestro estudio se establecieron siete grupos de edad para poder comparar los patrones de colonización.

La prevalencia de colonización por *P. aeruginosa* varía con la edad, abarcando desde el 25% en menores de 5 años hasta un 80% en mayores de 25 años. Un estudio previo con población española describe que el 80% de los pacientes mayores de 18 años están colonizados por *P. aeruginosa* (Oliver, y cols., 2009)

A lo largo de los cuatro periodos de nuestro estudio se observó una disminución de la prevalencia de los pacientes colonizados por *P. aeruginosa*, especialmente dentro del grupo de los menores de 10 años. Esto es compatible con una primocolonización más tardía, probablemente debida a un mejor manejo de los pacientes. A partir de los 11 años y en todos los periodos del estudio se incrementa su prevalencia. En la comparación dentro de cada grupo etario, en el Periodo C (2006-2007) se detectó la menor tasa (20%) para el grupo etario de 11 a 15 años, al cual pertenecían la mayoría de los pacientes que habían sido previamente vacunados frente a *P. aeruginosa*.

Las cepas iniciales de primocolonización suelen presentar morfotipos no mucosos, más parecidos a los habituales en los aislados ambientales. La colonización por *P. aeruginosa* inicialmente es intermitente, pero posteriormente se hace crónica, marcando un punto de inflexión en la evolución de la enfermedad, apareciendo con frecuencia cepas con morfotipo mucoso, con gran producción de exopolisacáridos, más problemático y difícil de tratar y/o erradicar.

El aislamiento de cepas de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso ya fue descritos en 1969 por Robert G. Doggett, el cual observó que el 70% de sus pacientes con FQ tenían aislamientos mucosos. Recientemente, se ha descrito en pacientes mayores, a partir de los 10 años (Valenza y cols., 2008). En nuestra Unidad de FQ, el morfotipo mucoso fue el más representado en el Periodo A (1993-1995), en todos los rangos de edad, en concreto, el 80% de los pacientes de menos de 20 años presentaban el morfotipo mucoso, que pasó a ser el 100% en los mayores de 21 años. En los siguientes periodos el morfotipo mucoso fue inferior en la etapa de primocolonización de los pacientes con menor edad. En concreto, el morfotipo mucoso se encontró presente en valores inferiores al 20% para el rango de edad de 0 a 10 años, en cifras cercanas al 35% en el

grupo entre 11 y 20 años y se aisló entre el 44-50% a partir de los 21 años de edad.

En el seguimiento de los pacientes de la Unidad durante los cuatro periodos estudiados, los logros que se han conseguido como que el morfotipo mucoso esté presente en bajos porcentajes en los pacientes de más corta edad y que en los mayores de 21 años haya disminuido hasta el 44%, quizás también sea como consecuencia de la política agresiva de antibióticos que hemos comentado anteriormente y al intento de erradicación de *P. aeruginosa* desde la primera colonización bronquial, punto clave en la progresión de la enfermedad. Los pacientes colonizados durante los 5 primeros años de vida tienen un mayor riesgo de mortalidad que los pacientes sin colonización y sobre todo los que tienen colonizadas las vías aéreas inferiores (Sagel y cols., 2009).

En todos los periodos estudiados los pacientes atendidos en la Unidad con colonización intermitente son mayoría en las edades más tempranas, llegando a alcanzar el 100% de pacientes en el grupo de menores de 5 años del periodo D (2010-2011). Aunque siguió existiendo un alto porcentaje de de pacientes con colonización intermitente a partir de los 30 años, el porcentaje de estos pacientes va disminuyendo con la edad, ya que evolucionaron a una colonización crónica. En el estudio de Bonestroo detectan colonización crónica por *P. aeruginosa* en el 40% de un grupo de pacientes de 3 a 19 años (Bonestroo, y cols., 2010). Esta tasa de colonización/infección crónica fue inferior en España en 2010 (27,4%) (Zolin, y cols., 2014).

Estudio de la primocolonización por *P. aeruginosa*

En el segundo bloque de la Tesis, realizamos un estudio de la primocolonización por *P. aeruginosa*. Sin lugar a dudas, el momento en el que se produce la primocolonización marca la supervivencia y la calidad de vida del paciente. Para la búsqueda de factores asociados a la aparición de *P. aeruginosa* se analizaron los datos epidemiológicos y clínicos de un grupo de pacientes en los que se podía datar eventos de primocolonización, correspondiéndose con un total de 25 pacientes.

Hasta en el 60% de los pacientes (15 pacientes de los 25 seleccionados) se confirmó el diagnóstico de FQ antes de los 18 meses de vida aunque se realizó cribado neonatal únicamente en dos pacientes. Todos ellos fueron diagnosticados antes de los 10 años, exceptuando el Paciente 6 que sucedió en la edad adulta.

El caso de este Paciente 6 es especial porque la prueba del test del sudor fue positiva únicamente en una de las tres veces en que se le realizó y las mutaciones del gen CFTR que posee (R1066/D1152H), frecuentes en la población del sur de Europa (Castellani y cols., 2008), permiten una función residual de la proteína CFTR (Green y cols., 2010).

Los otros pacientes presentan una actividad funcional mínima de esta proteína CFTR debido a la gravedad de sus mutaciones. La mutación más frecuente fue la delección de la fenilalanina en el codón 508 (F508del), presente en un 83,3 % de los casos (37% homocigóticos y 46% heterocigóticos). Esta cifra es similar a la observada en el noroeste de Europa (87%) y en los Estados Unidos (70-85 %) en la población general de pacientes con FQ (Estivill X, 1997). Esta frecuencia es superior a la obtenida en trabajos realizados en España en los que se halla un 51% de F508del. El genotipo homocigótico F508del es una de los principales factores de riesgo que se relacionan con una adquisición temprana de *P. aeruginosa*, seguido en importancia pertenecer al sexo femenino (Maselli y cols., 2003)(Ranganathan y cols., 2013) (Rosenfeld y cols., 2012).La siguiente mutación en frecuencia que detectan es G542X (7%) al igual que en nuestros pacientes (Alonso y cols., 2007) (García Hernández y cols., 2004).

En el estudio multicéntrico “GMS study” con sólo pacientes homocigóticos para F508del (para minimizar el efecto de la genética) se concluye que los pacientes con cultivo positivo para *P. aeruginosa* antes de los 5 años tienen mayor riesgo de sufrir enfermedad pulmonar grave respecto a los que lo tuvieron a los 10 años de edad. (Pittman y cols., 2011)

Entre los pacientes seleccionados (n=25) la edad media de detección del primer aislado de *P. aeruginosa* fue de 8,5 años (rango de <1 a >36 años). No se encontraron diferencias significativas cuando se calculó este

dato para algunos subgrupos de pacientes. En función de características inherentes al individuo como la base genética o sexo resultó que en el grupo de pacientes del sexo femenino (n=11) y homocigóticos F508del (n=9) la edad media en el momento de la primera *P. aeruginosa* fue de 8 y 11 años, respectivamente. De la misma forma, considerando una característica modificable como la ubicación del lugar de residencia habitual, encontramos que en los pacientes del área no metropolitanas (n=10) la edad media de adquisición de *P. aeruginosa* fue de 7,2 años frente a los 9 años de aquellos de un área metropolitana (n=15). Este hallazgo coincide con los datos encontrados por Ranganathan que describe esta influencia geográfica con un mayor porcentaje de pacientes con cultivos positivos para *P. aeruginosa* (47% vs 18%) y con edades inferiores (2,3 vs 3,1 años) en áreas no metropolitanas respecto a las metropolitanas.

En el caso de analizar la influencia de haber recibido la vacuna frente a *P. aeruginosa*, la edad de adquisición de este microorganismo en el subgrupo vacunado (48%, n=12) fue ligeramente inferior (5,3 años) respecto al grupo no vacunado pediátrico (6,0 años). Ya que todos los pacientes del subgrupo vacunado eran pediátricos en este momento del primer aislado, resulta más conveniente comparar esta cifra con los 5,6 años de la edad del primer aislamiento de *P. aeruginosa* en el grupo de pacientes pediátricos (n=22) para concluir que no se aprecian diferencias significativas.

El 20% de los 25 pacientes de nuestro estudio presentaron un primer cultivo positivo para *P. aeruginosa* en su primer año de vida y el 64% antes de los 7 años. Es una mayor prevalencia que la hallada en estudios previos como el de Kerem que describe que el 12% de los pacientes presentaron *P. aeruginosa* antes del primer año de vida y casi la mitad (44%) a los 7 años (Kerem, y cols., 1990). En nuestro caso, la edad media de adquisición de *P. aeruginosa* teniendo en cuenta solamente a la población pediátrica fue de 5,6 años, ligeramente superior a la evidenciada por otros grupos, como por ejemplo los 3,25 años del importante estudio observacional "EPIC" (Rosenfeld y cols., 2012). En ese estudio concluyen que la determinación genética influye más en la edad

de adquisición de *P. aeruginosa* que ninguno de los factores de riesgo modificables que evaluaron.

Otros de los factores de riesgo habituales para la adquisición de *P. aeruginosa* es la colonización previa por *S. aureus* (Maselli y cols., 2003) (Rosenfeld y cols., 2012) y el uso de antibioterapia en el periodo previo (Kosorok y cols., 1998)(Ratjen y cols., 2001). La edad media del paciente cuando se aisló la primera *P. aeruginosa* fue superior en los pacientes pediátricos (72%, n=16) con *S. aureus* durante el año previo al aislamiento de *P. aeruginosa* (6,2 años) respecto al total de la población pediátrica (5,6 años). No se hallaron diferencias significativas en aquellos pacientes que habían recibido tratamiento previo.

En los pacientes (28%, n=7) que tenían un percentil de índice de masa corporal (IMC) inferior al percentil 10 se aisló este microorganismo a una edad media inferior (4 años). Sucedió en 5 pacientes al año de vida (71%). Recientemente se ha descrito que los niños pequeños con primocolonización temprana presentan un retraso en su crecimiento tanto en peso como en altura (Trandafir y cols., 2013). Es este grupo de pacientes con menores índices de masa corporal los que experimentan con mayor frecuencia enfermedades pulmonares graves (Kerem y cols., 2014).

Algunos pacientes no recibieron tratamiento erradicador por no presentar síntomas de infección. Douglas describió que menos de la mitad de los pacientes (48,5%) presentan síntomas respiratorios en la primera detección de *P. aeruginosa* (Douglas y cols., 2009). En el resto de pacientes, el antimicrobiano más utilizado fue ciprofloxacino vo seguido de tobramicina iv y ceftazidima iv. En cuanto al tratamiento antibiótico de mantenimiento la tobramicina inhalada fue el fármaco más utilizado, después azitromicina vo y en menor proporción la colistina inhalada.

Durante el periodo de 1994 a 2011, para algunos pacientes la primera colonización fue el único aislado, otros presentaron varias primocolonizaciones, otros progresaron a fases intermitentes y tres a fase crónica. Es importante resaltar que hemos detectado colonización crónica por *P. aeruginosa* en 3 pacientes de edades muy tempranas, y en concreto en dos de ellos la cronificación ocurrió a la edad de 3 y 5 años.

En datos publicados tras la aplicación del programa de cribado neonatal, en algunos grupos tienen el éxito de no detectar colonización persistente antes de los 4 años (Gartner & Cobos, 2009) aunque en otros, como Douglas, sí refieren aislamiento temprano de cepas con morfotipo mucoso (Douglas y cols., 2009).

En el estudio del cultivo de las muestras respiratorias de los 25 pacientes en el momento de la primocolonización la situación más frecuente hallada fue la de co-colonización de *P. aeruginosa* con otros microorganismos, principalmente *S. aureus*, seguido de *H. influenzae*.

Con el objetivo de caracterizar los aislados de *P. aeruginosa* que se detectan en las fases de primocolonización broncopulmonar, se estudiaron los aislados disponibles de primocolonización y los posteriores durante el seguimiento de los pacientes, desde 1994 a 2009.

Los aislados detectados en esta etapa de primocolonización presentaban alta diversidad de morfotipos, con un predominio de morfotipo rugoso, seguido de enterobacteriaceo, metálico o puntiforme y finalmente el fenotipo mucoso que fue el menos abundante (8,7%). En cambio, en la fase de colonización/ infección intermitente y crónica se aislaron un 24,7% y un 46,6% de *P. aeruginosa* con morfotipo mucoso, respectivamente. Estas cifras están en concordancia con una publicación del año 2014, en la que se describe que el morfotipo mucoso de los aislados de *P. aeruginosa* permite distinguir la transición a la fase crónica de la colonización/infección además de actuar como un factor predictivo de exacerbaciones pulmonares (Mayer-Hamblett y cols., 2014).

Los aislados de *P. aeruginosa* en fase de primocolonización presentaron bajas tasa de resistencia a los antimicrobianos habitualmente empleados en el tratamiento erradicador como ciprofloxacino, tobramicina y ceftazidima. La resistencia a colistina es casi anecdótica, en concordancia con el hecho de que es utilizada en menor proporción. En la literatura científica se describen series de *P. aeruginosa* procedentes de las primeras fases de la colonización sin resistencia a tobramicina (Tramper-Stranders y cols., 2012) y de la fase de colonización intermitente con un 4% de resistencia a ciprofloxacino (Hansen, y cols., 2008). Cuando no se hace distinción según la fase en la

que se aisló *P. aeruginosa* como en la serie italiana de los años 90 de Manno, el porcentaje de aislados sensibles a ciprofloxacino (73,7%) y tobramicina (76,5%) es inferior a la que muestran los aislados totales de los 25 pacientes e igual para la ceftazidima (86%) (Manno y cols., 2005).

En el grupo de pacientes estudiados, observamos que el 15,5 % de los aislados presentaban multirresistencia, existiendo diferencias en cuanto al número de cepas de *P. aeruginosa* multirresistentes aisladas en la fase de primocolonización (n=5, 10%) y en las fases posteriores (n=28, 18%). Estos valores son inferiores a las descritas en Reino Unido con aproximadamente el 40% de aislados con resistencia a dos o más antimicrobianos, principalmente ceftazidima, gentamicina y piperacilina (Pitt, y cols., 2003).

Las infecciones respiratorias crónicas asociadas a FQ, a pesar de que presentan elevada colonización bacteriana en los esputos, son muy poco invasivas, no citotóxicas y raramente progresan a infección sistémica, aunque debido a que estas infecciones pueden persistir durante décadas, acaban resultando en un grave deterioro del epitelio pulmonar que conlleva a la muerte del paciente. La cronicidad en este tipo de infecciones, se debe principalmente a las adaptaciones específicas de *P. aeruginosa* a las vías respiratorias de los pacientes con FQ, que incluyen la formación de biopelículas.

En la actualidad se discute la utilidad de los métodos de rutina tradicionales utilizados en los laboratorios de microbiología, que emplean bacterias planctónicas para el estudio de sensibilidad de las cepas de *P. aeruginosa* aisladas de muestras respiratorias de los paciente con FQ debido a que no mimetizan las condiciones de su crecimiento habitual en biopelículas o biofilms en el pulmón del paciente con esta enfermedad crónica (Chernish & Aaron, 2003) (Miller & Gilligan, 2003).

Algunos autores, como por ejemplo Donlan (Donlan & Costerton, 2002) consideran que cualquier método que precise estimar la eficacia de un tratamiento frente a bacterias con crecimiento en biofilms debe utilizar bacterias sésiles (en biofilms) y no células planctónicas. Los métodos estándares de estudio de sensibilidad, como la microdilución en caldo recomendada por el CLSI, no pueden estimar exactamente la

eficacia antimicrobiana frente a bacterias en biofilms, porque estas técnicas se basan en la exposición a los antimicrobianos de los organismos planctónicos y no de las bacterias sésiles.

En este estudio se ha utilizado el método propuesto por Moskowitz (Moskowitz, y cols., 2004) para el estudio de la sensibilidad de microorganismos con crecimiento en biofilms y que puede aproximarse a la situación real que ocurre *in vivo*. Además, en nuestro estudio se ha definido la concentración mínima para prevenir la formación de biofilm (CPB) que se determinó mediante una modificación en el método de Moskowitz, ya explicada detalladamente en el apartado correspondiente en Material y Métodos. Este valor acercaría más a la realidad la actuación de los antimicrobianos en las primeras fases de la colonización en las que la formación de biofilms juega un papel relevante.

Coincidiendo con las expectativas, comprobamos que la concentración de antimicrobiano requerida para prevenir la formación de biopelículas es inferior que para inhibirla una vez formado aunque es superior a la necesaria en crecimiento planctónico. Los antimicrobianos con una cinética rápida de muerte como las fluoroquinolonas, los aminoglucósidos y la colistina, presentaron los valores más bajos la concentración mínima inhibitoria para la prevención de formación de biofilm, CPB. También son activos en biofilms ya formados como se aprecia por sus valores de CIB. Por el contrario, comprobamos una drástica reducción del efecto inhibitorio en biofilms de los antimicrobianos betalactámicos.

Los estudios de genética de poblaciones proporcionan información sobre la estructura poblacional y la naturaleza de la variación genética que existe en las poblaciones naturales ya que la cantidad de variación genética de una población es un parámetro fundamental, debido a que determina el potencial evolutivo de ésta. La dinámica de aparición y selección de mutantes o la importancia relativa de la mutación y de la recombinación de estas poblaciones, son efectos esenciales para comprender los cambios epidemiológicos que se producen en ellas. Como las tasas de mutación normalmente son muy bajas, la presión de mutación por sí sola produce cambios muy lentos en las frecuencias génicas de las poblaciones. La aparición de un mutante que presenta

cierta ventaja ecológica sobre el resto de individuos de la población, por la selección natural se provoca un incremento mayor de este clon en la población. La hipermutación podría actuar como un mecanismo de aceleración de evolución bacteriana en la naturaleza. La primera evidencia de un entorno específico para la selección de cepas hipermutadoras de la población natural se obtuvo del estudio de *P. aeruginosa* en pacientes con FQ (Oliver, y cols., 2000). En este trabajo publicado en el año 2000, se encontró una alta prevalencia de cepas de *P. aeruginosa* mutadoras (20% de los aislamientos, el 37% de los pacientes) en pacientes con FQ colonizados crónicamente (Oliver, y cols., 2000). En pacientes daneses, el porcentaje de aislamientos hipermutadores aumentó del 0% al inicio de la colonización hasta el 65% después de 20 años de colonización crónica (Ciofu, y cols., 2005).

En nuestro estudio analizamos la frecuencia de mutación de 70 aislados de 24 pacientes, en su mayoría de primcolonización pero también de la fase intermitente de la colonización/infección y no encontramos ninguna cepa fuertemente mutadora aunque si se detectaron diez aislados débilmente mutadores (14%) procedentes de 8 pacientes (33%). En otros estudios de las primeras fases de la colonización se ha observado una cierta prevalencia de cepas hipermutadoras (5-10%) y débilmente mutadoras (16%) (Kenna y cols., 2007) (Montanari y cols., 2007) (Mena y cols., 2008) (Tramper-Stranders y cols., 2012). De los 36 aislados de la fase de colonización inicial, el 61 % fueron normomutadoras, 17 % hipomutadoras, 22 % débilmente mutadoras y ninguna fuertemente mutadora. Solamente se detectó una asociación entre el morfotipo mucoso y una mayor frecuencia de mutación, y el morfotipo rugoso y una menor frecuencia de mutación.

El estudio de la epidemiología actual de los aislados de *P. aeruginosa* se basa en el genotipado, ya que se ha mostrado muy superior a los métodos fenotípicos (Onteniente, y cols., 2000). Tradicionalmente, el campo pulsado se ha considerado la técnica molecular más eficaz por su poder discriminatorio, pero su reproducibilidad entre laboratorios es baja (Anthony y cols., 2002). Actualmente, esta técnica se utiliza principalmente para estudiar la epidemiología local de cada centro y puede ser de gran importancia a la hora de determinar las medidas de

control para evitar el contagio o transmisión cruzada (Saiman & Siegel, 2004).

En la presente tesis se ha analizado por PFGE-*SpeI* 196 *P. aeruginosa* aisladas de los pacientes desde su primera colonización/infección hasta el año 2009. Hemos visto una alta diversidad genética en las cepas de *P.aeruginosa*. Se ha detectado que dos pacientes comparten el mismo pulsotipo de PFGE en aislados de primocolonización (Paciente 16 y Paciente 25), aunque en nuestra Unidad de FQ se siguen las medidas de separación de pacientes recomendadas internacionalmente (Kerem, y cols., 2005).

En los últimos años la aplicación del MLST (Curran, y cols., 2004) (Vernez, y cols., 2005), ha permitido un fácil intercambio de información entre laboratorios al utilizar un código de perfiles alélicos cuya información se almacena en internet (<http://pubmlst.org>) lo que constituye una de sus mayores ventajas. Al contrario que con otros sistemas, no presenta dificultad de sistematización. Una limitación para su aplicación en los aislados de FQ sería debido a que uno de los siete locus empleados, el locus *mutL*, implicado en el sistema mismatch repair, esta habitualmente alterado en aislamientos hipermutadores frecuentes en FQ (García-Castillo, y cols., 2012) (López-Causapé, y cols., 2012)

En el estudio de los 33 aislados de primocolonización por *P. aeruginosa* de los 25 pacientes se identificaron 30 STs; 28 de ellas no relacionadas y las otras dos corresponden a *single locus variants* (SLV) (ST253 y ST540). La escasa relación genética entre las STs halladas sugiere que los clones involucrados en primocolonización corresponden a sucesos de adquisición no relacionados entre sí.

Algunos aislados compartían el mismo STs, como ST312 (n=2, con idéntico pulsotipo PFGE), ST508 (n=2) y ST274 (n=3).

En particular, la ST274 que ha sido descrita en pacientes con FQ de España (García-Castillo, y cols., 2011), otros países Europeos (Ocampo-Sosa, y cols., 2012) y en Australia se ha detectado en los aislados de primocolonización de tres de los pacientes (Paciente 3, Paciente 10 y

Paciente 15) en los años 2000, 1995 y 1997, respectivamente. En la base de datos de MLST (<http://pubmlst.org/paeruginosa/>) figuran aislamientos con esta ST de pacientes con FQ en fechas posteriores: 2002 (Francia, París, no epidémico), 2003 (España, Baleares, no epidémico), 2007 (Australia, Queensland, no epidémico), 2008 (Australia, varias zonas, epidémico), 2009 (Australia, Queensland, no epidémico), 2009 y 2012 (España, Baleares, no epidémico).

Algunas de las STs de primocolonización han sido descritas previamente en pacientes con FQ, tanto en nuestra unidad de FQ en aislados en fase de colonización crónica (ST274 y ST508) (Fernández-Olmos, y cols., 2013), como en aislados descritos previamente en España con ST-179 (epidémico en 2008, VIM-2), ST-253, ST-274 (epidémico en 2012).

También cabe destacar que no hemos detectado ninguna cepa perteneciente a los linajes epidémicos internacionales, ni a nivel europeo (clones holandeses ST406 y ST497, clon de Liverpool ST146 y Clon de Manchester ST148) ni a nivel mundial (clon de Melbourne ST141). Aunque existe una relación genética considerable entre el clon holandés ST497 y ST17 que agrupa cepas de primocolonización y de colonización crónica. Tampoco tenemos constancia de que el ubicuo clon C ST117 colonizara alguno de los pacientes de nuestra Unidad de FQ.

Aunque no están considerados epidémicos, si hemos detectado aislados pertenecientes a 19 STs que se han descrito en Australia, Austria, Brasil, Canada, Hungría, Japón, Polonia, Senegal, España, Holanda, Reino Unido. China (ST395 en 2006, resistente a carbapenem, en una muestra de esputo), Francia (ST274 y ST395 en 2011, con fenotipo resistente, en muestras de agua de Francia) (Deredjian, y cols., 2011)

Pertenecientes a pacientes con FQ son coincidentes 18 STs con las descritas en España, Francia, Holanda y Australia. En concreto, coinciden 11 STs con las encontradas en pacientes con FQ de Australia: ST27, ST170, ST179, ST236, ST244, ST252, ST253, ST270, ST274 (epidémico), ST-508, ST-569 (Base de datos <http://pubmlst.org/paeruginosa/>).

También hemos encontrado linajes que se han descrito en pacientes no-FQ (ST-244), coincidentes tanto con clones circulantes mayoritarios en hospitales españoles (ST274, ST395), como con otros clones detectados en infecciones nosocomiales (ST27, ST253, ST244 ST508, ST606) (García-Castillo, y cols., 2011), sugiriendo una posible adquisición de estos clones circulantes en el sistema sanitario español.

En el análisis filogenético de los aislados de pacientes de la Unidad de FQ, independiente para los 7 alelos MLST, el resultado fue que las cepas se agruparon en 4 clústeres filogenéticos distintos (I-IV). No se pudo diferenciar ningún tipo de relación entre los aislados causantes de primocolonización, ya que todos los aislados estaban repartidos por igual entre los 4 clústeres, de la misma forma que ocurrió en el estudio de aislados de colonización crónica, en la que adicionalmente una cepa se separó del resto de clústeres (ST1045). Los clones epidémicos internacionales quedaron en los grupos I y III.

En la presente tesis se han realizado estudios de la epidemiología a nivel molecular de cepas de *P. aeruginosa* aisladas de los pacientes desde su primera colonización/infección hasta el año 2009. Se han categorizado los aislados de cada paciente como pertenecientes a la fase de primocolonización (PC), colonización/infección intermitente o crónica (no-PC), empleando criterios basados en el tiempo que transcurre entre dos cultivos positivos para *P. aeruginosa*. Es importante el concepto de primocolonización que además de ser el primer cultivo positivo para Pa, también es la aparición de un cultivo positivo después de un año del tratamiento erradicador.

Un análisis importante ha consistido en evaluar la relevancia de los datos de la epidemiología molecular en la interpretación de los datos clínicos de los pacientes, en el seguimiento de las fases de colonización y en el efecto erradicador del tratamiento antimicrobiano que recibieron. Ya se ha descrito que los métodos de microbiología molecular empleados en los aislados de cultivos positivos pueden revelar falsas erradicaciones o nuevas colonizaciones (*Munck y cols., 2001*).

Una aportación de esta Tesis fue la evaluación de la técnica comercial rep-PCR DiversiLab, que habitualmente no es utilizada y el estudio de la

correlación con los resultados de las técnicas de referencia y con los datos clínicos. Nuestros resultados indican que en los pacientes con varios aislados de la categoría de primocolonización se correspondieron, en general, con nuevas colonizaciones en el paciente y no falsas erradicaciones mediante PFGE-*SpeI* y rep-PCR DiversiLab, existiendo una gran concordancia en los resultados de ambas técnicas, con algunas excepciones.

Las discrepancias halladas consistieron en que DiversiLab asignó patrones diferentes a las cepas que comparten un pulsotipo PFGE idéntico. DiversiLab fue capaz de detectar mejor las pequeñas diferencias de los aislados. En concreto, DiversiLab asignó en dos pacientes distinto patrón en primocolonización, lo que supondría una nueva y en cuatro pacientes asignó distinto patrón al aislamiento después de que el paciente reciba tratamiento erradicador, que modifica la interpretación de la eficacia del tratamiento. Un comportamiento parecido en donde DiversiLab (rep-PCR) muestra divergencias genéticas entre aislados del mismo PFGE ha sido explicado (Doléans-Jordheim y cols., 2009) como un posible reflejo de las variaciones genéticas entre aislados estrechamente relacionados que esta técnica sería capaz de detectar.

Por otra parte, en la literatura científica se ha descrito que DiversiLab y PFGE podrían tener el mismo poder de discriminación para evaluar un clon multirresistente aislado durante 17 meses (Ratkai y cols., 2010). En nuestro estudio, obtuvimos discrepancia de resultados en las cepas aisladas en fechas muy próximas entre sí. Al compartir los aislados mismo pulsotipo de PFGE significaría que el tratamiento erradicador no fue eficaz. Por su parte, mediante DiversiLab los aislados presentan diferencias. Se puede concluir que mediante rep-PCR DiversiLab se pueden detectar pequeños cambios evolutivos.

Otro objetivo de esta Tesis fue la adaptación de técnicas de espectrometría de masas MALDI-TOF empleando programas como el MALDI Biotyper para el análisis de la clonalidad de *P. aeruginosa*. Aunque la principal utilidad de esta técnica es la identificación bacteriana, podríamos utilizar los espectros o huella espectrales que se generan para

analizar sus diferencias y tratar de establecer relaciones fenotípicas entre los aislados.

En primer lugar, se obtuvieron buenos resultados en la identificación de *P. aeruginosa* aisladas de muestras respiratorias de pacientes con FQ. Se pudo realizar esta identificación directamente de la colonia sin método de extracción previo, con independencia de su morfotipo incluyendo mucosos o puntiformes (SCV). Es importante esta capacidad de la técnica ya que estas variantes pueden presentar baja actividad bioquímica y dificultades para crecer en algunos medios de cultivos impidiendo su identificación mediante los métodos fenotípicos habituales (Fernández-Olmos, y cols., 2012).

En segundo lugar, para el proceso de adaptación de las técnicas de espectrometría de masas para el análisis de la clonalidad, se creó una base de datos o librería de referencia de espectros. En los estudios de reproducibilidad realizados se obtuvo como resultado que existía una variabilidad en los espectros ya que únicamente entre el 40-70% de los picos aparecían en todos los espectros que son necesarios para obtener los valores de m/z representativos de esa muestra("huella espectral"). Esto implica que los resultados del estudio de la estructura poblacional van a estar influidos por las condiciones en las que se obtienen los espectros de masas y que sería aconsejable minimizar las diferencias.

Cuando hemos empleado estas herramientas en el estudio de persistencia del mismo clon en un paciente a lo largo de los años hemos obtenido muy buena similitud y agrupación grafica entre las cepas de ese paciente. Sin embargo, en nuestra experiencia, cuando en la comparación intervienen aislados de varios pacientes no tiene capacidad de discriminación. En nuestro análisis de las cepas tanto de primocolonización como de seguimiento destaca que a pesar de la gran facilidad de su creación, la morfología de los dendrogramas obtenidos empleando MALDI Biotyper no ha sido consistente. Por tanto, podemos decir que no se han obtenido buenos resultados en todas las muestras estudiadas debido a la influencia en la reproducibilidad.

Probablemente, aunque el poder de discriminación de otras técnicas empleadas en estudios epidemiológicos como la electroforesis de campo

pulsado (PFGE) no pueda ser accesible por la resolución conseguida por la espectrometría de masas MALDI-TOF a nivel de subespecie, el perfil peptídico pueda ser válido para realizar un pre-screening rutinario que reduzca la necesidad de utilizar métodos adicionales más laboriosos y costosos. Si bien no hay que olvidar que su empleo tiene limitaciones, ya que aunque sí que permite realizar una clasificación “químico-taxonomica”, no permiten una clasificación filogenética que precisa de marcadores biológicos adecuados, como proteínas ribosomales conservadas.

Detección precoz de *P. aeruginosa* mediante técnicas de microbiología molecular

En el último bloque de la Tesis se ha desarrollado la idea de la necesidad de unas técnicas rápidas y sensibles para la detección de *P. aeruginosa* en el momento del primer aislamiento. Ya que un tratamiento antibiótico agresivo es crucial para prevenir o posponer la colonización crónica se incrementa la importancia de la detección de *P. aeruginosa* de muestras respiratorias por PCR.

Actualmente no es habitual emplear técnicas moleculares para la detección de *P. aeruginosa* directamente de muestras respiratorias en pacientes con FQ a pesar de que se han descrito en las últimas décadas varios esquemas para su detección mediante PCR (Karpati & Jonasson, 1996; Clarke y cols., 2003). Existe disparidad en los resultados encontrados por diferentes grupos, ya que algunos autores han evidenciado que la PCR proporciona una mayor sensibilidad en comparación con el cultivo y/o pruebas bioquímicas para la detección de este microorganismo en muestras respiratorias de pacientes FQ (Da Silva Filho y cols., 2007) mientras que otros autores no encontraron diferencias (Qin, y cols., 2003) o incluso obtuvieron una menor sensibilidad (Lavenir, y cols., 2007).

En el ámbito de la detección precoz, pocos estudios han comparado el cultivo y los métodos moleculares empleando muestras clínicas de pacientes FQ sin colonización por *P. aeruginosa* (Xu y cols., 2010) a pesar

de que se ha sugerido que el cultivo pudiera no detectar fácilmente este microorganismo en las primeras fases de la colonización (West S. y cols., 2000). El objetivo de nuestro estudio fue evaluar si la PCR mejora la detección de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias de pacientes FQ aun no crónicamente infectados-colonizados por este microorganismo.

Una etapa crítica de la detección de *P. aeruginosa* directamente de las muestras respiratorias es la extracción del ADN. En nuestro caso se optó por una extracción semiautomática con sílice magnética mediante la plataforma NucliSens easyMAG (BioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Este sistema NucliSens easyMAG es un instrumento de extracción universal flexible en el que se pueden elegir diferentes tipos de muestra y volúmenes de elución por lo que ha sido validado por varios autores (Wilson, y cols., 2004; Tang, y cols., 2005; Loens, y cols., 2007). El protocolo empleado con las muestras de nuestros pacientes de 2005 al 2008 destacó por su alta sensibilidad en un estudio publicado posteriormente en 2009 de comparación de varios métodos de extracción empleando esputos de FQ (Deschaght y cols., 2009).

La etapa más característica de los procedimientos analíticos basados en PCR es la amplificación. Entre las limitaciones de esta técnica se encuentra que la eficiencia de amplificación nunca es del 100%. Esta eficiencia depende de factores como la composición de la muestra, la secuencia diana, los cebadores y el número de ciclos. La detección de los fragmentos de ADN amplificados se realiza de manera habitual empleando geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio, una sonda fluorescente que se intercala entre la doble hélice de ADN. Se ha demostrado que las detecciones basadas en PCR a tiempo real son más sensibles (Deschaght y cols., 2009; Jaffe, y cols., 2001; Anuj y cols., 2009). Respecto al aspecto crítico de la elección de los cebadores en función de la diana seleccionada, en nuestro estudio, por una parte, se empleó como diana específica para *P. aeruginosa* el gen *oprL* que mostró una adecuada sensibilidad en la bibliografía disponible en el momento del diseño del estudio (De Vos y cols., 1997; Xu, y cols., 2004). Por otra parte, de forma novedosa se seleccionó el gen *mucA*, cuya inactivación es responsable de la aparición del morfotipo mucoso de *P. aeruginosa* (Boucher, y cols., 1997), empleado por algunos autores en el análisis de

polimorfismos (Pozuelo, y cols., 2011)). Desde el punto de vista práctico, la ventaja de este cebador es que presenta una temperatura de hibridación parecida a la de *oprL*, lo que permite optimizar la etapa de amplificación a nivel de tiempo y coste de empleo del termociclador.

En dos estudios que emplearon para la PCR el mismo cebador (*oprL*) que en nuestro estudio, aunque con la técnica de PCR en tiempo real, obtuvieron discrepancias entre el cultivo y la PCR del 3 y 17% (10 muestras) (Deschaght y cols., 2010), (Xu y cols., 2004). Estos autores concluyeron que resultaba incierto el potencial de esta técnica para establecer los episodios de colonización/infección de forma precoz al cultivo. Sin embargo, en ambos estudios, las conclusiones deberían ser interpretadas con cautela debido al bajo número de casos (n=5) que presentan el interesante resultado de ser cultivo negativo/ PCR positiva con posterior cultivo positivo de *P. aeruginosa*.

En nuestro estudio, se realizó el seguimiento de 34 pacientes sin infección/colonización por *P. aeruginosa* desde diciembre 2005 a diciembre del 2008, analizándose 317 muestras respiratorias por PCR para la detección precoz de *P. aeruginosa*.

El 5,5% de las muestras respiratorias analizadas que fueron negativas por cultivo pero positivas por PCRs, mediante *mucA* (n=13), *oprL* (n=1) o ambos (n=3), pertenecían a 15 pacientes. De los cuales, siete presentaron primocolonización por *P. aeruginosa* en un periodo medio de un año (rango 4 - 22 meses) y tres colonización intermitente previa y posteriormente. Estos hallazgos están en concordancia con los encontrados por Deschaght y cols., con resultados de PCR positiva entre 4 - 17 meses antes del primer cultivo positivo (Deschaght y cols., 2010).

De forma contraria, cinco muestras con cultivo positivo de *P. aeruginosa* resultaron negativas en las dos PCRs específicas. La inhibición de las PCRs específicas parece posible aunque en todas obtuvieron resultados positivos en la PCR de 16SrADN. Si la distribución de la bacteria en la muestra fuera poco uniforme, al emplear diferentes alícuotas de la muestra para hacer el cultivo y la PCR, el azar puede influir en el resultado negativo de la PCR.

Existen estudios que sugieren que la PCR puede detectar infecciones en pacientes que han sido previamente tratados con antibióticos e infecciones en pacientes en fases tardías de la enfermedad (Williamson y cols., 1992). Aunque no parece muy probable por la demora en el tiempo, este hecho puede indicar que la PCR detecta ADN de las bacterias ya muertas, que al no ser viables proporcionan resultados de cultivo negativo.

En nuestro estudio, en ningún caso parece haberse obtenido un resultado falso positivo debido a contaminación cruzada de muestras negativas con muestras altamente positivas como consecuencia de aerosoles o fallos de pipetas ya que estos riesgos son inherentes a los procesos de extracción manual en manos poco expertas. No se ha detectado la influencia en los resultados debido a la cantidad de muestra inicial, el morfotipo o genotipo de *P. aeruginosa*. Las reacciones cruzadas con otros microorganismos no parecen probables aunque la especificidad del primer o cebador *mucA* utilizado no queda confirmada por otros autores como en el caso de *oprL* para un amplio espectro de patógenos de FQ (Deschaght y cols., 2009). Estudios futuros con un mayor número de muestras discrepantes entre los resultados del cultivo y PCR podrían determinar la influencia de algunos de estos factores.

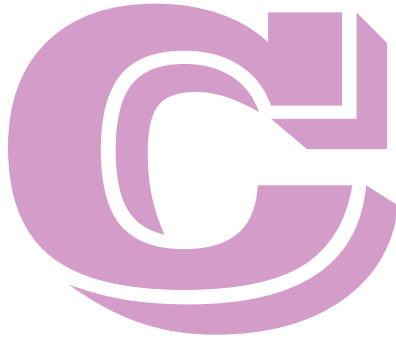
No se obtuvieron resultados positivos en la PCR de 16SrADN en seis muestras de las 317 analizadas, lo que supone si no hubiera utilizado este control de integridad ese 2% de las muestras habrían sido consideradas como negativas. Son buenos resultados de porcentaje de inhibición de la amplificación si se comparan con la experiencia de otros grupos cuyos porcentajes de fallos para muestras respiratorias son del 10-20%, teniendo en cuenta que restos de moco pueden inhibir la PCR. Se han considerado como resultados con PCR nula ya que esta reacción se ha empleado como control de la viabilidad de la muestra, para garantizar una correcta extracción del ADN bacteriano y/o una falta de inhibición de la PCR. Una muestra pertenecía al grupo de cultivo positivo para *P. aeruginosa* y las otras cinco muestras, de 4 pacientes distintos, presentaron cultivo negativo.

Respecto a los índices de validez de las técnicas de amplificación específicas para detectar *P. aeruginosa* en muestras respiratorias de

pacientes con FQ sin colonización crónica por este microorganismo, se ha demostrado que la PCR empleando el cebador *oprL* tiene una sensibilidad del 63,2 % y una especificidad del 98,6% mientras que la PCR mediante el cebador *mucA* presenta un valor de sensibilidad mayor (73,7%) pero con menor especificidad (94,5%). De gran importancia resulta el valor predictivo positivo de la prueba y a este respecto existe una gran diferencia entre los VPP para *oprL* y *mucA*, siendo del 75,0% y 46,7%, respectivamente, aunque no son buenos valores en ambos casos. Para el VPN, las diferencias resultan menores entre el 97,6% y el 98,2% de *oprL* y *mucA*, respectivamente.

Para determinar si la amplificación por de PCR para la detección de *P. aeruginosa* en muestras respiratorias presenta un buen carácter pronóstico de cultivo positivo para *P. aeruginosa* en el seguimiento del paciente, se reanalizaron los datos obtenidos considerando como referencia el cultivo positivo tanto simultáneo como posterior en muestras del paciente, alcanzándose valores más óptimos para VPP de 100% para *oprL* y 83,3% para *mucA*.

En conclusión, se podrían beneficiar de la detección de *P. aeruginosa* mediante métodos moleculares aquellos laboratorios de microbiología en los que no emplea de forma rutinaria el cultivo cuantitativo mediante siembra en espiral ya que un número pequeño de colonias de *P. aeruginosa* podrían no ser visualizadas al estar mezcladas con otras bacterias, con la importancia que esto conlleva sobre todo en aquellos pacientes en la fase de primocolonización. De esta forma, mediante un método molecular rápido de screening podrían detectarse esas *P. aeruginosa* en bajo recuento en las primeras fases de la colonización/infección. En el caso de no poder disponer de estas técnicas en esos laboratorios, se podría realizar este diagnóstico en laboratorios de referencia, especialmente en aquellos pacientes con FQ sin colonización por *P. aeruginosa* que presenten un empeoramiento clínico. Necesitamos saber todavía el coste-beneficio de emplear las dos técnicas, las implicaciones clínicas de los resultados discrepantes y las consideraciones de emplear tratamiento antibiótico si solo la PCR es positiva.



CONCLUSIONES

1. El análisis de los datos de la colonización broncopulmonar de los pacientes atendidos en la Unidad de Fibrosis Quística (FQ) del Hospital Universitario Ramón y Cajal en los periodos 1993-1995, 2002-2003, 2006-2007 y 2010-2011 ha demostrado que la distribución de las especies bacterianas fue similar en todos los periodos, a pesar de las diferentes medidas preventivas clínicas implantadas (vacunación frente a *P. aeruginosa*, suero salino hipertónico y tratamiento con azitromicina).
2. Se ha detectado una disminución progresiva de la prevalencia de *Pseudomonas aeruginosa*, retrasándose en el último periodo la edad de primocolonización.
3. La edad media de adquisición de *P. aeruginosa* es de 8,5 años en los pacientes seleccionados para estudiar su primocolonización, destacando que en un 28% de los pacientes se produce durante el primer año de vida. Se asoció significativamente un retraso en la primocolonización en los pacientes con mayor índice de masa corporal y una colonización previa por *Staphylococcus aureus*.
4. Los aislados de primocolonización presentan una baja tasa de resistencia a los antimicrobianos antipseudomónicos habitualmente empleados en el tratamiento erradicador. En estos aislados, la hipermutación no es un mecanismo relevante aunque existe una proporción relativamente elevada de cepas débilmente mutadoras (22%).
5. Se ha definido un nuevo parámetro denominado Concentración Preventiva de la formación de un Biofilm (CPB) que podría ser útil para correlacionar los estudios microbiológicos *in vitro* con los resultados clínicos. La CPB es inferior a la que se necesita para

inhibirlo una vez ya formado. Este parámetro es fundamental para optimizar el tratamiento erradicador de la primocolonización.

6. La alta diversidad genética detectada en nuestras cepas de primocolonización demuestra eventos de adquisición independiente con escasa transmisión entre los pacientes. No se detectó ningún clon epidémico internacional de *P. aeruginosa*.
7. Existe una gran concordancia en los resultados obtenidos mediante rep-PCR DiversiLab y las otras técnicas de epidemiología molecular empleadas, debiéndose las discrepancias observadas a una elevada sensibilidad en la detección de pequeñas variaciones.
8. La espectrometría de masa MALDI TOF identifica correctamente los aislados de *P. aeruginosa* de los pacientes con FQ con independencia de su morfotipo y forma de crecimiento. Esta técnica también es válida para el estudio de la persistencia de un mismo clon a lo largo de los años en un solo paciente, aunque no tiene capacidad de discriminar aislados de varios pacientes.
9. La amplificación por PCR para los genes *oprL* y *mucA* detecta precozmente la presencia de *P. aeruginosa* en esputos con cultivo negativo y podría implementarse como método molecular rápido de cribado en las fases de primocolonización en las que es de esperar un bajo recuento de microorganismos viables.



ABREVIATURAS



ABPA: Aspergilosis broncopulmonar alérgica

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AK: Amikacina

AUDC: Ácido ursodeoxicólico

AZM: Azitromicina



BAL: Lavado broncoalveolar

BAS: Broncoaspirado

BCSA: *Burkholderia cepacia Selective Agar*

BD: Broncodilatador

BE: Bronquiectasias

BHI: Brain heart infusion



C-: Cultivo negativo

C+: Cultivo positivo

CAZ: Ceftazidima

CBB: Concentración bactericida de biopelícula

CFF: “*Cystic Fibrosis Foundation*” de los EE.UU.

CFP: Cefepime

CFTR: *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulador*

CIB: Concentración inhibitoria de biopelícula

CIP: Ciprofloxacino

CLSI: *Clinical and Laboratory Standard Institute*

CMB: Concentración mínima bactericida

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CFGAC: Consorcio de Análisis Genético de Fibrosis Quística

CPB: Concentración preventiva de biopelícula

CT: Colistina

CTX: Cefotaxima

D

DE: Desviación estandar

DNasa: Dornasa alfa

DMRFQ: Diabetes mellitus relacionada con la fibrosis quística

DO: Densidad óptica

E

EARSS: *European Antimicrobial Resistance Surveillance System*

EDTA: Ácido etilén-diamino-tetracético

EHSC: Enfermedad hepática sin cirrosis

ELISA: Ensayo de inmunoabsorción enzimática

EM: Espectrometría de masas

F

F508del: Delección de la fenilalanina en el codón 508

FEV₁: Volumen de gas espirado en el primer segundo de la espiración forzada

FOS: Fosfomicina

FQ: Fibrosis quística

H

HE: Hemoptisis

I

IC 95%: Intervalo de Confianza del 95%

Ig: Immunoglobulina

IL: interleuquina

inh: Vía inhalada

IP: Insuficiencia pancreática

IPM: Imipenem

iv: Vía intravenosa

K

kb: Kilobases

L

LB: *Luria Broth*

LEVO: Levofloxacin

LPS: Lipopolisacárido

M

MAI: *Mycobacterium avium intracellulare*

MALDI-TOF: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*

(desorción/ionización por láser asistida por matriz) -
analizador *Time of Flight* (tiempo de vuelo).

MENSURA: Mesa Española de Normalización de la Sensibilidad y
Resistencia a los Antimicrobianos

MHB: Mueller-Hinton en medio líquido

MLST: *Multilocus sequence typing*

N

ND: No determinado

O

OFPVL: Oxidación, Fermentación, Polimixina, Vancomicina, Lactosa

ORF: *Open reading frame* (Fragmento de lectura abierta)

P

pb: Pares de bases

PBPs: *Penicillin Binding Proteins*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*; Reacción en Cadena de la Polimerasa

PFGE: *Pulse-Field Gel Electrophoresis*; Electroforesis en geles de campo pulsado

PMNs: Neutrófilos polimorfonucleares



Rep: *Repetitive Extragenic Palindromic*

r.p.m.: Revoluciones por minuto



SAC: Sabouraud-cloranfenicol-actidione

SC: Sabouraud-cloranfenicol

SCVs: *Small colony variants*

SLE: Superficie líquida del epitelio

SPSS: *Statistical Product and Service Solutions*

SS: Suero salino

SSH : Suero salino hipertónico

ST: Secuencia tipo



TBE: Tampón TRIS + ácido bórico + EDTA

TE: Tampón TRIS-HCL + EDTA

TIR: Tripsinógeno sérico inmunorreactivo

TOB: Tobramicina



UFC/ml: Unidades formadoras de colonias por ml de muestra



VF: Volumen final

vo: Vía oral

VT: Volumen total



LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Clases de mutaciones de la proteína CFTR.....	7
Figura 2. Respuesta inflamatoria local en la mucosa respiratoria en pacientes con fibrosis quística con colonización patogénica.....	8
Figura 3. Criterios diagnósticos de FQ clásica.	12
Figura 4. Criterios diagnósticos de FQ no clásica.	12
Figura 5. Esquema de protocolo de diagnostico de la FQ, basado en los síntomas clínicos.	13
Figura 6. Evolución de los microorganismos que colonizan la vía aérea en el paciente con FQ con el aumento de la edad del paciente.	15
Figura 7. Colonización/infección pulmonar en los pacientes con FQ por grupos de edad.....	19
Figura 8. Prevalencia de <i>P. aeruginosa</i> en pacientes con FQ de diferentes edades, de 1995 a 2005 en EEUU.	23
Figura 9. Representación esquemática del crecimiento en forma de biopelícula.	47
Figura 10. Estructura de las biopelículas.....	49
Figura 11. Fotografía tomada por microscopía confocal de un crecimiento en biopelícula en ausencia o presencia de antimicrobianos.....	53
Figura 12. Morfotipos de colonias de <i>P. aeruginosa</i>	68

Figura 13. Esquema de trabajo para determinación de CIB	72
Figura 14. Esquema de trabajo para determinación de CPB	73
Figura 15. Esquema del proceso de extracción.....	83
Figura 16. Flujo de trabajo EM MALDI-TOF.....	85
Figura 17. Distribución por grupos etarios de los pacientes incluidos en los periodos A, B, C y D.....	92
Figura 18. Porcentaje de pacientes colonizados/infectados por los diferentes microorganismos en cada periodo de estudio.	93
Figura 19. Porcentaje de pacientes colonizados/infectados por más de un microorganismo.	94
Figura 20. Distribución de <i>P. aeruginosa</i> según grupo de edad y periodo.	95
Figura 21. Distribución de la colonización/infección por <i>P. aeruginosa</i> según el grupo de edad de los pacientes de cada periodo estudiado.....	96
Figura 22. Distribución de los diferentes morfotipos de <i>P. aeruginosa</i> según el grupo de edad al que pertenecían los pacientes de cada periodo estudiado.....	97
Figura 23. Edades de los 25 pacientes en el momento de la primocolonización por <i>P. aeruginosa</i>	92
Figura 24. Cronograma de muestras analizadas, resaltando las positivas para <i>P. aeruginosa</i>	99

Figura 25. Prevalencia de los morfotipos de <i>P. aeruginosa</i> según el tipo de colonización pulmonar.	100
Figura 26. Resultados de sensibilidad a los antimicrobianos.....	104
Figura 27. Porcentajes de resistencia a betalactámicos por morfotipo.	105
Figura 28. Porcentajes de resistencia a no betalactámicos por morfotipo.	105
Figura 29. Porcentajes de resistencia en crecimiento planctónico y en biopelícula	108
Figura 30. Distribución en tres zonas de las frecuencias de mutación de los aislados estudiados.....	110
Figura 31. Distribución de las frecuencias de mutación según el morfotipo.	111
Figura 32. Distribución de la frecuencia de mutación según el momento de colonización/infección pulmonar.....	112
Figura 33. Evolución de la frecuencia de mutación en los aislados de los Pacientes 19, 21 y 22.....	113
Figura 34. Dendrograma PFGE de las 25 primeras <i>P. aeruginosa</i>	114
Figura 35. Minimum Spaning Tree de los aislados de <i>P. aeruginosa</i> esporádicos y crónicos en comparación con los clones aislados en los hospitales españoles y los grandes clones internacionales de FQ.....	119
Figura 36. Análisis filogenético.....	120

Figura 37. Dendrograma DiversiLab de 25 primeras <i>P. aeruginosa</i>	122
Figura 38. Dendrograma y matriz similitud DiversiLab de 19 cepas de <i>P. aeruginosa</i> de primocolonización y de colonización intermitente.....	123
Figura 39. Dendrograma obtenido mediante MALDI Biotyper de las 25 cepas <i>P. aeruginosa</i> de primocolonización.....	125
Figura 40. Dendrograma con cepas aisladas del Paciente 23	126
Figura 41. Dendrograma de cepas de seguimiento del Paciente 19.....	127
Figura 42. Resultados obtenidos mediante las cuatro técnicas en las 25 primeras cepas	129
Figura 43. Amplicones de PCR en geles de agarosa	131

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estadios de la infección-colonización por <i>P. aeruginosa</i> en pacientes FQ.....	26
Tabla 2. Especificidad para detectar <i>P. aeruginosa</i> mediante PCR según el cebador.	34
Tabla 3 . Características de la amplificación por PCR.....	87
Tabla 4 . Características clínicas basales de los pacientes.	96
Tabla 5 . Factores de riesgo durante el año previo al primer aislamiento de <i>P. aeruginosa</i>	97
Tabla 6 . Resumen de co-colonización con otros microorganismos	101
Tabla 7 . Características de las cepas de primocolonización de <i>P. aeruginosa</i> de los 25 pacientes.....	102
Tabla 8. Concentración preventiva, inhibitoria y bactericida en biopelícula.	107
Tabla 9. Relaciones entre los valores de sensibilidad en biopelícula.....	109
Tabla 10. Resumen de pulsotipos PFGE	116
Tabla 11. Resumen de ST de MLST.....	117
Tabla 12. Comparación de los resultados obtenidos para cada técnica en las cepas de primocolonización y de colonización crónica.	129

Tabla 13. Resultados de cultivo vs PCR de <i>P. aeruginosa</i>	132
Tabla 14. Resultados para <i>oprL</i>	134
Tabla 15. Resultados para <i>mucA</i>	134
Tabla 16. Índices de validez.....	134
Tabla 17. Resultados pronósticos para <i>oprL</i>	136
Tabla 18. Resultados pronósticos para <i>mucA</i>	136
Tabla 19. Índices de validez pronósticos.....	136



BIBLIOGRAFÍA



Aaron, S., Ferris, W., Ramotar, K., Vandemheen, K., Chan, F., & Saginur, R. (2002). Single and combination antibiotic susceptibilities of planktonic, adherent, and biofilm-grown *Pseudomonas aeruginosa* isolates cultured from sputa of adults with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 40:4172-4179.

Abman, S., Ogle, J., Harbeck, R., Butler-Simon, N., Hammond, K., & Accurso, F. (1991). Early bacteriologic, immunologic, and clinical courses of young infants with cystic fibrosis identified by neonatal screening. *J Pediatr*, 119:211-217.

Aleksandrov, A., Aleksandrov, L., & Riordan, J. (2007). CFTR (ABCC7) is a hydrolyzable-ligand-gated channel. *Pflugers Arch*, 453: 693-702.

Alonso, M., Heine-Suner, D., Calvo, M., Rosell, J., Gimenez, J., Ramos, M., . . . Casals, T. (2007). Spectrum of mutations in the CFTR Gene in cystic fibrosis patients of Spanish ancestry. *Ann Hum Genet*, 71:194-201.

Amorena, B., Gracia, E., Monzón, M., Leiva, J., Oteiza, C., Pérez, M., . . . Hernández-Yago, J. (1999). Antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* in biofilms developed in vitro. *J Antimicrobial Chem*, 44: 43-55.

Anthony, M., Rose, B., Pegler, M., Elkins, M., Service, H., Thamotharampillai, K., . . . Harbour, C. (2002). Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 40:2772-2778.

Anuj, S., Whiley, D., Kidd, T., Bell, S., Wainwright, C., Nissen, M., & Sloots, T. (2009). Identification of *Pseudomonas aeruginosa* by a duplex real-time

polymerase chain reaction assay targeting the *ecfX* and the *gyrB* genes. *Diagn Microb Infect Dis*, 63:127-131.

Anwar, H., Strap, J., & Costerton, J. (1992). Susceptibility of biofilm cells of *Pseudomonas aeruginosa* to bactericidal actions of whole blood and serum. *FEMS Microbiol Lett*, 92:235-242.

Anwar, H., Strap, J., Chen, K., & Costerton, J. (1992). Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrob Agents Chemother*, 36:1208-1214.

Asensio de la Cruz, O., Bosque García, M., Pérez, A., Montón Soler, C., & Espasa Soley, M. (2012). Fibrosis quística y sus manifestaciones respiratorias. *Pediatr Integral*, XVI:156-169.




Barbuddhe, S., Maier, T., Schwarz, G., Kostrzewa, M., Hof, H., Domann, E., . . . Hain, T. (2008). Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 74:5402-5407.

Barrio, M., García, G., Gartner, S., & Grupo de trabajo de FQ, y. (2009). Protocolo de diagnóstico y seguimiento de los pacientes con fibrosis quística. *An Pediatr*, 71:250-264.

Bernarde, C., Keravec, M., Mounier, J., Gouriou, S., Rault, G., Férec, C., . . . Héry-Arnaud, G. (2015). Impact of the CFTR-Potentiator Ivacaftor on Airway Microbiota in Cystic Fibrosis Patients Carrying A G551D Mutation. *PLoS One*, 8;10:e0124124.

Biddick, R., Spilker, T., Martin, A., & LiPuma, J. (2003). Evidence of transmission of *Burkholderia cepacia*,

- Burkholderia multivorans and Burkholderia dolosa among persons with cystic fibrosis. *Fems Microbiol Lett*, 228:57-62.
- Bittar, F., & Rolain, J. (2010). Detection and accurate identification of new or emerging bacteria in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 16:809-820.
- Blázquez, J. (2003). Hypermutation as a factor contributing to the acquisition of antimicrobial resistance. *Clin Infect Dis*, 37:1201-1209.
- Bonestroo, H., de Winter-de-Groot, K., van der Ent, C., & Arets, H. (2010). Upper and lower airways cultures in children with cystic fibrosis: Do not neglect the upper airways. *J Cys Fibros*, 9:130-134.
- Boucher, J., Yu, H., Mudd, M., & Deretic, V. (1997). Mucoid Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: characterization of muc mutations in clinical isolates and analysis of clearance in a mouse model of respiratory infection. *Infect Immun*, 65:3838-3846.
- Boucher, R. (2002). An overview of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*, 54:1359-1371.
- Boucher, R. (2003). Regulation of airway surface liquid volume by human airway epithelia. *Pflugers Arch*, 445:495-498.
- Bragonzi, A., Wiehlmann, L., Klockgether, J., Cramer, N., Worlitzsch, D., Doring, G., & Tummeler, B. (2006). Sequence diversity of the mucABD locus in Pseudomonas aeruginosa isolates from patients with cystic fibrosis. *Microbiology*, 152:3261-3269.
- Branda, S., Vik, S., Friedman, L., & Kolter, R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol*, 13:20-26.
- Brennan, S. (2008). Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatr Respir Rev*, 9:271-279.
- Buchanan, P., Ernst, R., Elborn, J., & Schock, B. (2009). Role of CFTR, Pseudomonas aeruginosa and Toll-like receptors in cystic fibrosis lung inflammation. *Biochem Soc Trans*, 37:863-867.
- Burns, J., Gibson, R., McNamara, S., Yim, D., Emerson, J., Rosenfeld, M., . . . Ramsey, B. (2001). Longitudinal assessment of Pseudomonas aeruginosa in young children with cystic fibrosis. *J Infect Dis*, 183:444-452.
- Busquets, N., Baroni, M., Ochoteco, M., Zurbriggen, M., Virgolini, S., & Meneghetti, F. (2013). Aislamientos bacterianos de muestras respiratorias de pacientes pediátricos con fibrosis quística y su distribución por edades. *Rev argent microbiol*, 45:44-49.
- 
- Cabrolie, N., Sauget, M., Bertrand, X., & Hocquet, D. (2015). Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Identifies Pseudomonas aeruginosa High-Risk Clones. *J Clin Microbiol*, 53:1395-1398.
- Cantón, R., & del Campo, R. (2010). Cystic fibrosis: deciphering the complexity. *Clin Microbiol Infect*, 16:793-797.
- Cantón, R., & Fernández- Olmos, A. (2012). Colonización patogénica broncopulmonar. En A. Salcedo, S. Gartner, R. Girón, & M. García Novo, *Tratado de fibrosis quística* (págs. 97-107). Madrid: Editorial Justim.
- Canton, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero, F., Honorato, J., Gartner, S., . . . García-Quetglas, E. (2005). Tratamiento antimicrobiano frente a la colonización por Pseudomonas aeruginosa en el paciente con fibrosis

Quística. *Arch Bronconeumol*, 41 Supl 1:1-25.

Canton, R., Cobos, N., de Gracia, J., Baquero, F., Honorato, J., Gartner, S., . . . Spanish Consensus Group for Antimicrobial Therapy in the Cystic Fibrosis Patient, y. (2005). Antimicrobial therapy for pulmonary pathogenic colonisation and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 11:690-703.

Cantón, R., Máiz, L., Escribano, A., Oliveira, C., Oliver, A., Asensio, O., . . . Solé, A. (2015). Spanish Consensus on the Prevention and Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* Bronchial Infections in Cystic Fibrosis Patients. *Arch Bronconeumol*, 51:140-150.

Cantón, R., Oliver, A., & Baquero, F. (1998). Microbiología de las vías respiratorias en la fibrosis quística. En F. Dapena Fernández, *Fibrosis quística, atención integral, manejo clínico y puesta al día* (págs. 105-158). Granada: Editorial Alhulia.

Cantón, R., Valdezate, S., Vindel, A., Sánchez Del Saz, B., Maíz, L., & Baquero, F. (2003). Antimicrobial susceptibility profile of molecular typed cystic fibrosis *Stenotrophomonas maltophilia* isolates and differences with noncystic fibrosis isolates. *Pediatr Pulmonol*, 35:99-107.

Casals, T. (2008). CFTR: del gen a la proteína. En N. Cobos, *Fibrosis quística* (págs. 13-26). Zaragoza: Neumología y salud SL.

Castellani, C., Cuppens, H., Macek, M. J., Cassiman, J., Kerem, E., Durie, P., . . . Dequeker, E. (2008). Consensus on the use and interpretation of cystic fibrosis mutation analysis in clinical practice. *J Cyst Fibros*, 7:179-96.

Ceri, H., Olson, M., Stremick, C., Read, R., Morck, D., & Buret, A. (1999). The

Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*, 37:1771-1776.

CFF. (2012). *Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry. Annual Data Report*. Bethesda, Maryland.

Chernish, R., & Aaron, S. (2003). Approach to resistant gram-negative bacterial pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 9:509-515.

Chmielek, J., & Davis, P. (2003). State of the art: why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection? *Respir Res*, 4:8.

Chmielek, J., & Konstan, M. (2007). Inflammation and anti-inflammatory therapies for cystic fibrosis. *Clin Chest Med*, 28:331-346.

Chmielek, J., Berger, M., & Konstan, M. (2002). The role of inflammation in the pathophysiology of CF lung disease. *Clin Rev Allergy Immunol*, 23:5-27.

Cimolai, N., Trombley, C., Davidson, A., & Wong, L. (1995). Selective media for isolation of *Burkholderia* (*Pseudomonas*) *cepacia* from the respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Pathol*, 48:488-90.

Ciofu, O., Riis, B., Pressler, T., Poulsen, H., & Hoiby, N. (2005). Occurrence of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients is associated with the oxidative stress caused by chronic lung inflammation. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 2276-2282.

Clarke, L., Moore, J., Millar, B., Garske, L., Xu, J., Heuzenroeder, M., . . . Elborn, J. (2003). Development of a diagnostic PCR assay that targets a heat-shock protein gene (*groES*) for detection of

- Pseudomonas* spp. in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*, 52:759-763.
- Clunes, M., & Boucher, R. (2007). Cystic Fibrosis: The Mechanisms of Pathogenesis of an Inherited Lung Disorder. *Drug Discov Today Dis Mech*, 4:63-72.
- Cobben, N., Drent, M., Jonkers, M., Wouters, E., Venechoutte, M., & Stobberingh, E. (1996). Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections due to contaminated nebulizers. *J Hosp Infect*, 33:63-70.
- Coenye, T., Goris, J., Spilker, T., Vandamme, P., & LiPuma, J. (2002). Characterization of unusual bacteria isolated from respiratory secretions of cystic fibrosis patients and description of *Inquilinus limosus* gen. nov., sp nov. *J Clin Microbiol*, 40:2062-2069.
- Coll, P., Coque, M., Domínguez, M., Vázquez, J., & Vila, J. (2005). Métodos moleculares de tipificación epidemiológica en bacteriología. *Procedimientos microbiológicos SEIMC nº 18*.
- Courneau, A., Accurso, F., White, T., Campbell, P., Hoffman, G., Parad, R., & al, e. (2007). Guideline for implementation of cystic fibrosis newborn-screening programs: Cystic Fibrosis Foundation Work-shop. *Pediatrics*, 119:e495-519.
- Creagh, E., & O'Neill, L. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends Immunol*, 27:352-357.
- Curran, B., Jonas, D., Grundmann, H., Pitt, T., & Dowson, C. (2004). Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbio*, 42:5644-5649.
- Da Silva Filho, L., Levi, J., Bento, C., Ramos, S., & Rozov, T. (1999). PCR identification of *Pseudomonas aeruginosa* and direct detection in clinical samples from cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol*, 48:357-361.
- Da Silva Filho, L., Levi, J., Bento, C., Rodrigues, J., & Da Silvo Ramos, S. (2001). Molecular epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a cystic fibrosis outpatient clinic. *J Med Microbiol*, 50:261-267.
- Da Silva Filho, L., Tateno, A., Martins, K., Chernishev, A., De Oliveira Garcia, D., Haug, M., . . . Döring, G. (2007). The combination of PCR and serology increases the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa* colonization/infection in cystic fibrosis. *Ped Pulmonol*, 42:938-944.
- Da Silva Filho, L., Tateno, A., Velloso, L., & al, e. (2004). Identification of *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* complex, and *Stenotrophomonas maltophilia* in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR. *Ped Pulmonol*, 37:537-547.
- Davey, M., & O'Toole, G. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64:847-867.
- Davis, P. (2006). Cystic fibrosis since 1938. *Am J Respir Crit Care Med*, 173:475-482.
- Davis, P., Drumm, M., & Konstan, M. (1996). Cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 154:1229-1256.
- De Boeck, K., Wilschanski, M., Castellani, C., Taylor, C., Cuppens, H., Dodge, J., & al, e. (2006). Cystic fibrosis: terminology an diagnostic algorithms. *Thorax*, 61: 627-635.
- De Gracia, J., Alvarez, A., Mata, F., Guarner, L., Vendrell, M., Gadtner, S., & Cobos, N. (2002). Cystic Fibrosis in

adults :study of 111 patients. *Med clin*, 119:605-609.

De Vos, D., Lim, A., Pirnay, J., Struelens, M., Vandenvelde, C., Duinslaeger, L., . . . Cornelis, P. (1997). Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J Clin Microbiol*, 35:1295-1299.

Dean, T., Dai, Y., Shute, J., Church, M., & Warner, J. (1993). Interleukin-8 concentrations are elevated in bronchoalveolar lavage, sputum, and sera of children with cystic fibrosis. *Pediatr Res*, 34:159-161.

del Campo, R., Morosini, M., de la Pedrosa, E., Fenoll, A., Muñoz-Almagro, C., Máiz, L., . . . Network, S. P. (2005). Population structure, antimicrobial resistance, and mutation frequencies of *Streptococcus pneumoniae* isolates from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 43:2207-2214.

del Fresno, C., Gómez-Piña, V., Lores, V., Soares-Schanoski, A., Fernández-Ruiz, I., Rojo, B., . . . López-Collazo, E. (2008). Monocytes from cystic fibrosis patients are locked in an LPS tolerance state: down-regulation of TREM-1 as putative underlying mechanism. *PLoS One*, 16;3:e2667 .

Deredjian, A., Colinon, C., Brothier, E., Favre-Bonté, S., Cournoyer, B., & Nazaret, S. (2011). Antibiotic and metal resistance among hospital and outdoor strains of *Pseudomonas*. *Res Microbiol*, 162:689-700.

Deschaght, P., De Baere, T., Van Simaey, L., Van daele, S., De Baets, F., De Vos, D., . . . Vaneechoutte, M. (2009). Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas*

aeruginosa in sputum of cystic fibrosis patient. *BMC Microbiol*, 9:244.

Deschaght, P., Schelstraete, P., Lopes dos Santos, G., Van Simaey, L., Haerynck, F., Van daele, S., . . . De Baets, F. (2010). Comparison of culture and qPCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in not chronically infected cystic fibrosis patients. *BMC Microbiology*, 10:245.

Deschaght, P., Van daele, S., De Baets, F., & Vaneechoutte, M. (2011). PCR and the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in respiratory samples of CF patients. A literature review. *J Cyst Fibrosis*, 10:293-297.

Dieckmann, R., & Malorny, B. (2011). Rapid screening of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl Environ Microbiol*, 77:4136-4146.

Doléans-Jordheim, A., Cournoyer, B., Bergeron, E., Croizé, J., Salord, H., André, J., . . . Freney, J. (2009). Reliability of *Pseudomonas aeruginosa* semi-automated rep-PCR genotyping in various epidemiological situations. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 28:1105-1111.

Donaldson, S., & Boucher, R. (2003). Update on pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Curr Opin Pulm Med*, 9:486-491.

Donaldson, S., Bennett, W., Zeman, K., & al, e. (2006). Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med*, 354:241-250.

Donlan, R., & Costerton, J. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 15:167-193.

Döring, G., & Pier, G. (2008). Vaccines and immunotherapy against

Pseudomonas aeruginosa. *Vaccine*, 20;26:1011-1024.

Doring, G., Conway, S., Heijerman, H., Hodson, M., Hoiby, N., Smyth, A., & al, e. (2000). Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. *Eur Respir J*, 16:749-767.

Douglas, T., Brennan, S., Gard, S., Berry, L., Gangell, C., Stick, S., . . . Sly, P. (2009). Acquisition and eradication of *P. aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Eur Resp J*, 33_305-311.

Drevinek, P., & Mahenthiralingam, E. (2010). *Burkholderia cenocepacia* in cystic fibrosis: epidemiology and molecular mechanisms of virulence. . *Clin Microbiol Infect*, 16:821-830.

Driffield, K., Miller, K., Bostock, J., O'Neill, A., & Chopra, I. (2008). Increased mutability of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *J Antimicrob Chemother*, 61:1053-1056.



Elizur, A., Cannon, C., & Ferkol, T. (2008). Airway inflammation in cystic fibrosis. *Chest*, 133: 489-495.

Elkins, M., Robinson, M., Rose, B., & al, e. (2006). A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* , 354:229-240.

Emerson, J., Rosenfeld, M., McNamara, S., Ramsey, B., & Gibson, R. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 34:91-100.

Eng, P., Morton, J., Douglass, J., Riedler, J., & al, e. (1996). Short-term efficacy of ultrasonically nebulized hypertonic saline in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 21:77-83.

Engelhardt, J., Zepeda, M., Cohn, J., Yankaskas, J., & Wilson, J. (1994).

Expression of the cystic fibrosis gene in adult human lung. *J Clin Invest*, 93: 737-49.

Estivill X, B. C. (1997). Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat*, 10:135-54.



Farrell, P., Lau, H., Li, Z. K., Laxova, A., Green, C., & al., e. (2005). Evidence on improved outcomes with early diagnostic of cystic fibrosis through neonatal screening: enough is enough. *J Pediatr*, 147:S30-36.

Farrell, P., & Govan, J. (2006). *Pseudomonas* serology: confusion, controversy, and challenges. *Thorax*, 61:645-647.

Farrell, P., Rosenstein, B., White, T., Accurso, F., Castellani, C., Cutting, G., & al., e. (2008). Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Report. *J Pediatr*, 153: S4-14.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Alba, J., Morosini, M., Lamas, A., Romero, B., . . . Cantón, R. (2013). Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 51:2761-2765.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Maiz, L., Lamas, A., Baquero, F., & Cantón, R. (2012). In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents*, 40:173-176.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Morosini, M., Lamas, A., Maiz, L., & Cantón, R. (2012). MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from

cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 11:59-62.

Flume, P., O'Sullivan, B., Robinson, K., & al., e. (2007). Cystic fibrosis pulmonary guidelines: chronic medications for maintenance of lung health. *Am J Respir Crit Care Med*, 176:957-969.

Frederiksen, B., Koch, C., & Højby, N. (1997). Antibiotic treatment of initial colonization with *Pseudomonas aeruginosa* postpones chronic infection and prevents deterioration of pulmonary function in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 23:330-335.

Frederiksen, B., Koch, C., & Hoiby, N. (1999). Changing epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infection in Danish cystic fibrosis patients (1974-1995). *Pediatr Pulmonol*, 8:59-66.

Fux, C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., & Costerton, J. (2003). Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 1:667-83.



García Hernández, G., Antelo, C., Maiz, L., Girón, R., Salcedo, A., Martínez Gimeno, A., . . . Prados, C. (2004). Patients with cystic fibrosis managed at the cystic fibrosis units of Madrid: cross-sectional study of 387 subjects. *Med Clin (Barc)*, 122:698-700.

García-Castillo, M., del Campo, R., Baquero, F., Morosini, M., Turrientes, M., Zamora, J., & Cantón, R. (2011). Stationary biofilm growth normalizes mutation frequencies and mutant prevention concentrations in *Pseudomonas aeruginosa* from cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 17:704-711.

García-Castillo, M., del Campo, R., Morosini, M., Riera, E., Cabot, G., Willems, R., . . . Cantón, R. (2011). Wide dispersion of ST175 clone despite high genetic diversity of carbapenem-

nonsusceptible *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains in 16 Spanish hospitals. *J Clin Microbiol*, 49:2905-2910.

García-Castillo, M., Máiz, L., Morosini, M., Rodríguez-Baños, M., Suarez, L., Fernández-Olmos, A., . . . del Campo, R. (2012). Emergence of an *mutL* mutation causing multilocus sequence typing-pulsed-field gel electrophoresis discrepancy among *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol*, 50:1777-1778.

García-Hernández, G., Antelo, C., Maiz, L., Girón, R., Salcedo, A., Martínez Gimeno, A., . . . Prados, C. (2004). Patients with cystic fibrosis managed at the cystic fibrosis units of Madrid: cross-sectional study of 387 subjects. *Med Clin (Barc)*, 122:698-700.

Gartner, S., & Cobos, N. (2009). Cribado neonatal para la fibrosis quística. *An Pediatr (Barc.)*, 71:481-482.

Gibson RL, B. J. (2003). Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 15:918-51.

Gibson, L., & Cooke, R. (1958). A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine iontophoresis. *Pediatrics*, 23: 545-549.

Giusti, R. (2008). New York State Cystic Fibrosis Newborn Screening Consortium: Elevated IRT levels in African-American infants: implications for newborn screening in an ethnically diverse population. *Pediatr Pulmonol*, 43:638-641.

Giusti, R., Badgwell, A., & Iglesias, A. (2007). New York State Cystic Fibrosis Newborn Screening Consortium: The first 2.5 years of experience diverse population with cystic fibrosis newborn

screening in an ethnically. *Pediatrics*, 119:e460-467.

Green, A., Kirk, J., & Group, G. D. (2007). Guidelines for the performance of the sweat test for the diagnosis of cystic fibrosis. *Ann Clin Biochem*, 44: 25-34.

Green, D., McDougal, K., Blackman, S., Sosnay, P., Henderson, L., Naughton, K., . . . Cutting, G. (2010). Mutations that permit residual CFTR function delay acquisition of multiple respiratory pathogens in CF patients. *Respir Res*, 11:140.

H

Hansen, C., Pressler, T., & Høiby, N. (2008). Early aggressive eradication therapy for intermittent *Pseudomonas aeruginosa* airway colonization in cystic fibrosis patients: 15 years experience. *J Cyst Fibros*, 7:523-30.

Hansen, C., Pressler, T., Nielsen, K., Jensen, P., Bjarnsholt, T., & Hoiby, N. (2010). Inflammation in *Achromobacter xylosoxidans* infected cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*, 9:51-58.

Hatch, R., & Schiller, N. (1998). Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 42:974-977.

Hauser, A., Jain, M., Bar-Meir, M., & McColley, S. (2011). Clinical significance of microbial infection and adaptation in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 24:29-70.

Hayes, D., Farrell, P., Li, Z., & West, S. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* serological analysis in young children with cystic fibrosis diagnosed through newborn screening. *Pediatr Pulmonol*, 45:55-61.

Henry, R., Mellis, C., & Petrovic, L. (1992). Mucoid *Pseudomonas*

aeruginosa is a marker of poor survival in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 12:158-161.

Hoffman, L., Déziel, E., D'Argenio, D., Lépine, F., Emerson, J., McNamara, S., . . . Miller, S. (2006). Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:19890-5.

Hogardt, M., & Heesemann, J. (2010). Adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during persistence in the cystic fibrosis lung. *Int J Med Microbiol*, 300:557-562.

Høiby, N. (2000). Prospects for the prevention and control of pseudomonal infection in children with cystic fibrosis. *Paediatr Drugs*, 2:451-463.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents*, 35:322-332.

Hoiby, N., Flensburg, E., Beck, B., Friis, B., Jacobsen, S., & Jacobsen, L. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scand J Respir Dis*, 58:65-79.

Hollings, A., Granström, M., Vasil, M., Wretling, B., & Strandvik, B. (1987). Prospective study of serum antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* exoproteins in cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 25:1868-74.

Hoyle, B., Wong, C., & Costerton, J. (1992). Disparate efficacy of tobramycin on Ca²⁺, Mg²⁺, and HEPES-treated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Can J Microbiol*, 38:1214-1218.

Hull, J. T. A. (1998). Contribution of genetic. *Thorax*, 1018-21.

Hutchison, M., & Govan, J. (1999). Pathogenicity of microbes associated with cystic fibrosis. *Microbes Infect* , 1:1005-1014.

J

Jacquot, J., Tabary, O., & Clement, A. (2008). Hyperinflammation in airways of cystic fibrosis patients: what's new? . *Expert Rev Mol Diagn*, 8:359-363.

Jacquot, J., Tabary, O., Le Rouzic, P., & Clement, A. (2008). Airway epithelial cell inflammatory signaling in cystic fibrosis . *Int J Biochem Cell Biol*, 40:1703-1715.

Jaffe, R., Lane, D., & Bates, C. (2001). Real-time identification of *Pseudomonas aeruginosa* direct from clinical samples using a rapid extraction method and polymerase chain reaction (PCR) . *J Clin Lab Anal*, 15:131-137.

Johansen, H., & Gøtzsche, P. (2008). Vaccines for preventing infection with *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 8;(4):CD001399.

K

Kaplan, J., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:2633-2636.

Kappler, M., Kraxner, A., Reinhardt, D., Ganster, B., Griesse, M., & Lang, T. (2006). Diagnostic and prognostic value of serum antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Thorax*, 61:684-688.

Karpati, F., & Jonasson, J. (1996). Polymerase chain reaction for the detection of *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* and *Burkholderia cepacia* in sputum of patients with cystic fibrosis. *Mol Cell Probes*, 10:397-403.

Kenna, D., Doherty, C., Foweraker, J., Macaskill, L., Barcus, V., & Govan, J. (2007). Hypermutability in environmental *Pseudomonas aeruginosa* and in populations causing pulmonary infection in individuals with cystic fibrosis. *Microbiology*, 153: 1852-1859.

Kerem, E., Conway, S., Elborn, S., & Heijerman, H. (2005). Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus . *J Cyst Fibros*, 4:7-26.

Kerem, E., Conway, S., Elborn, S., Heijerman, H., & Consensus Committee, C. (2005). Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. *J Cyst Fibros*, 4:7–26.

Kerem, E., Corey, M., Gold, R., & Levison, H. (1990). Pulmonary function and clinical course in patients with cystic fibrosis after pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *J Pediatr*, 116:714-719.

Kerem, E., Viviani, L., Zolin, A., MacNeill, S., Hatziaiorou, E., Ellemunter, H., . . . Patient Registry Steering Group, E. (2014). Factors associated with FEV1 decline in cystic fibrosis: analysis of the ECFS patient registry. *Eur Respir J*, 43:125-33.

King, M., Dasgupta, B., Tomkiewicz, R., & al, e. (1997). Rheology of cystic fibrosis sputum after in vitro treatment with hypertonic saline alone and in combination with recombinant human deoxyribonuclease I. *Am J Respir Crit Care Med*, 156:173-177.

Koch, C., Cuppens, H., Rainisio, M., Madessani, U., Harms, H., Hodson, M., . . . ERCF, I. o. (2001). European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis (ERCF): comparison of major disease manifestations between patient with different classes of mutations. *Pediatr Pulmonol*, 31:1-12.

Kosorok, M., Jalaluddin, M., Farrell, P., Shen, G., Colby, C., Laxova, A., . . . Splaingard, M. (1998). Comprehensive analysis of risk factors for acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 26:81-88.

Kosorok, M., Zeng, L., West, S., Rock, M., Splaingard, M., Laxova, A., & al, e. (2001). Acceleration of lung disease in children with cystic fibrosis after *Pseudomonas aeruginosa* acquisition. *Pediatr Pulmonol*, 32:277-287.

L

Lambiase, A., Raia, V., Del Pezzo, M., Sepe, A., Carnovale, V., & Rossano, F. (2006). Microbiology of airway disease in a cohort of patients with cystic fibrosis. *BMC Infect Dis*, 11;6:4.

Langton, S., & Smyth, A. (2009). Antibiotic strategies for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* in people with cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 7:CD004197.

Lasa, I., Del Pozo, J., Penades, J., & Leiva, J. (2005). Bacterial biofilms and infection. *An Sist Sanit Navar*, 28:163-75.

Lavenir, R., Jocktane, D., Laurent, F., Nazaret, S., & Cournoyer, B. (2007). Improved reliability of *Pseudomonas aeruginosa* PCR detection by the use of the species-specific *ecfX* gene target. *J Microb Methods*, 70:20-29.

Lebecque, P., Leal, T., Zylberberg, K., Reyhler, G., Bossuyt, X., & Godding, V. (2006). Towards zero prevalence of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 5:237-244.

Lee, B., Haagensen, J., Ciofu, O., Andersen, J., Hoiby, N., & Molin, S. (2005). Heterogeneity of biofilms formed by nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with

cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 43:5247-5255.

Lenney, W. (2007). The future for lung disease in children. *Thorax*, 62: 1021-2.

Lipuma, J. (2010). The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 23:299-323.

Loens, K., Bergs, K., Ursi, D., Goossens, H., & Ieven, M. (2007). Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 45:421-425.

López-Causapé, C., Cabot, G., Mulet, X., Mena, A., Pérez, J., & Oliver, A. (2012). Clonal epidemiology and resistance evolution in *Pseudomonas aeruginosa* strains colonising the respiratory tract of cystic fibrosis patients from the Balearic Islands. *Clin Microbiol Infect*, 18(Suppl S3):575.

Lorè, N., Cigana, C., De Fino, I., Riva, C., Juhas, M., Schwager, S., . . . Bragonzi, A. (2012). Cystic fibrosis-niche adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* reduces virulence in multiple infection hosts. *PLoS One*, 7:e35648.

Loubieres, Y., Grenet, D., B, S.-B., Medioni, J., Landais, P., Ferec, C., & Stern, M. (2002). Association between genetically determined pancreatic status and lung disease in adult cystic fibrosis patients. *Chest*, 121:73-80.

Lyczak, J., Cannon, C., & Pier, G. (2002). Lung infection associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Revs*, 15:194-222.

M

Maciá, M., Blanquer, D., Togores, B., Saulea, J., Pérez, J., & Oliver, A. (2005). Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections.

Antimicrob Agents Chemother, 49:3382-3386.

Mah, T., & O'Toole, G. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, 9:34-39.

Mahenthiralingam, E., Campbell, M., Foster, J., Lam, J., & Speert, D. (1996). Random amplified polymorphic DNA typing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 34:1129-1135.

Máiz, L., Baranda, F., Coll, R., Prados, C., Vendrell, M., Escribano, A., . . . (Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery), S. (2001). Guideline for diagnosis and treatment of respiratory involvements in cystic fibrosis. SEPAR (Spanish Society of Pneumology and Thoracic Surgery) Guidelines. *Arch Bronconeumol*, 37:316-324.

Manno, G., Cruciani, M., Romano, L., Scapolan, S., Mentasti, M., Lorini, R., & Minicucci, L. (2005). Antimicrobial use and *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility profile in a cystic fibrosis centre. *Int J Antimicrob Agents*, 25:193-7.

Maselli, J., Sontag, M., Norris, J., MacKenzie, T., Wagener, J., & Accurso, F. (2003). Risk factors for initial acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis identified by newborn screening. *Pediatr Pulmonol*, 35:257-62.

Massie, R., Curnow, L., Glazner, J., Armstrong, D., & Francis, I. (2012). Lessons learned from 20 years of newborn screening for cystic fibrosis. *Med J Aust*, 196: 67-70.

May, T., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J., & al, e. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary

infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol*, 4:191-206.

Mayer-Hamblett, N., Rosenfeld, M., Gibson, R., Ramsey, B., Kulasekara, H., Retsch-Bogart, G., . . . Hoffman, L. (2014). *Pseudomonas aeruginosa* in vitro phenotypes distinguish cystic fibrosis infection stages and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med*, 190:289-97.

McCaffery, K., Olver, R., Franklin, M., & Mukhopadhyay, S. (1999). Systematic review of antistaphylococcal therapy in cystic fibrosis. *Thorax*, 54:380-383.

Mena, A., Maciá, M., Borrell, N., Moya, B., de Francisco, T., Pérez, J., & Oliver, A. (2007). Inactivation of the mismatch repair system in *Pseudomonas aeruginosa* attenuates virulence but favors persistence of oropharyngeal colonization in cystic fibrosis mice. *J Bacteriol*, 189:3665-3668.

Mena, A., Smith, E., Burns, J., Moskovitz, S., Speert, D., Pérez, J., & Oliver, A. (2008). Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. *J Bacteriol*, 190: 7910-7917.

Milla, C., & Warwick, W. (1998). Risk of death in cystic fibrosis patients with severely compromised lung function. *Chest*, 113: 1230-4.

Miller, M., & Gilligan, P. (2003). Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 41:4009-4015.

Miller, M., & Gilligan, P. (2003). Laboratory aspects of management of chronic pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 41:4009-4015.

Mishra, A., Greaves, R., & Massie, J. (2005). The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the

genomic era. *Clin Biochem Rev*, 26:135-53.

Montanari, S., Oliver, A., Salerno, P., Mena, A., Bertoni, G., Tümmler, B., . . . Bragonzi, A. (2007). Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis. *Microbiology*, 153: 1445-1454.

Montes-Cano, M., de la Horra, C., Dapena, F., Mateos, I., Friaza, V., Respaldiza, N., . . . Varela, J. (2007). Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*, 13:1008-1011.

Moore, J., Shaw, A., Howard, J., Dooley, J., & Elborn, J. (2004). Infection control and the significance of sputum and other respiratory secretions from adult patients with cystic fibrosis. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 3:8.

Morrison, A., & Wenzel, R. (1984). Epidemiology of infections due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*, 6:S627-S642.

Moskowitz, S., Foster, J., Emerson, J., & Burns, J. (2004). Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 42:1915-1922.

Motoshima, M., Yanagihara, K., Fukushima, K., & al, e. (2007). Rapid and accurate detection of *Pseudomonas aeruginosa* by real-time polymerase chain reaction with melting curve analysis targeting *gyrB* genes. *Diagn Microb Infect Dis*, 58:53-58.

Muhlebach, M., Reed, W., & Noah, T. (2004). Quantitative cytokine gene expression in CF airway. *Pediatr Pulmonol*, 37:393-9.

Munck, A., Bonacorsi, S., Mariani-Kurkdjian, P., Lebourgeois, M., Gérardin, M., Brahimi, N., . . . Bingen, E.

(2001). Genotypic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* strains recovered from patients with cystic fibrosis after initial and subsequent colonization. *Pediatr Pulmonol*, 32:288-92.

Murray, T., Egan, M., & Kazmierczak, B. (2007). *Pseudomonas aeruginosa* chronic colonization in cystic fibrosis patients. *Curr Opin Pediatr*, 19:83-88.

N

Nguyen, D., & Singh, P. (2006). Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:8305-8306.

Nixon, G., Armstrong, D., Carzino, R., Carlin, J., Olinsky, A., Robertson, C., & al, e. (2001). Clinical outcome after early *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J Pediatr*, 138:699-704.

Novais, Â., Sousa, C., de Dios Caballero, J., Fernandez-Olmos, A., Lopes, J., Ramos, H., . . . Peixe, L. (2014). MALDI-TOF mass spectrometry as a tool for the discrimination of high-risk *Escherichia coli* clones from phylogenetic groups B2 (ST131) and D (ST69, ST405, ST393). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33:1391-1399.

O

O'Toole, G., Kaplan, H., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54:49-79.

Ocampo-Sosa, A., Domínguez, M., Gago, J., Juan, C., Tubau, F., Rodríguez, C., . . . Spanish Network for Research in Infectious Diseases, (. (2012). Genetic markers of widespread extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Antimicrob Agents Chemother*, 56:6349-6357.

Oliver, A., & Mena, A. (2010). Bacterial hypermutation in cystic fibrosis, not only for antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect*, 16:798–808.

Oliver, A., Alarcón, T., Caballero, E., & Cantón, R. (2009). Microbiological diagnosis of bronchopulmonary colonization-infection in cystic fibrosis. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 27:89-104.

Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science*, 288:1251-1253.

Onteniente, L., Brisse, S., Tassios, P., & Vergnaud, G. (2000). Evaluation of the polymorphisms associated with tandem repeats for *Pseudomonas aeruginosa* strain typing. *J Clin Microbiol*, 41:4991-4997.

P

Parad, R., Gerard, C., Zurakowski, D., Nichols, D., & Pier, G. (1999). Pulmonary outcome in cystic fibrosis is influenced primarily by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* infection and immune status and only modestly by genotype. *Infect Immun*, 67:4744-4750.

Pitt, T., Sparrow, M., Warner, M., & Stefanidou, M. (2003). Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax*, 58:794-796.

Pittman, J., Calloway, E., Kiser, M., Yeatts, J., Davis, S., Drumm, M., . . . Knowles, M. (2011). Age of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition and subsequent severity of cystic fibrosis lung disease. *Pediatr pulmonol*, 46:497-504.

Pozuelo, M., Jiménez, P., Valderrey, A., Fernández-Olmos, A., Cantón, R., & Rotger, R. (2011). Polimorfismo de los

genes *mucA* y *fpvA* en *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística: coexistencia de variantes genéticas en el mismo paciente. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 29:26-31.

Pressler, T., Karpati, F., Granström, M., Knudsen, P., Lindblad, A., Hjelte, L., . . . CF Study Consortium, S. (2009). Diagnostic significance of measurements of specific IgG antibodies to *Pseudomonas aeruginosa* by three different serological methods. *J Cyst Fibros*, 8:37-42.

Prober, C. (1991). The impact of respiratory viral infections in patients with cystic fibrosis. *Clin Rev Allergy*, 9:87-102.

Q

Qin, X., Emerson, J., Stapp, J., Stapp, L., Abe, P., & Burns, J. (2003). Use of real-time PCR with multiple targets to identify *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermenting gram-negative bacilli from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 41:4312-4317.

Quinton, P. (1999). Physiological basis of cystic fibrosis: A historical perspective. *Physiol Rev*, 3-22.


R

Rajan, S., & Saiman, L. (2002). Pulmonary infections in patients with cystic fibrosis. *Semin Respir Infect*, 17:47-56.

Ramsey, B. (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med*, 335:179-188.

Ramsey, B., Davies, J., McElvaney, N., Tullis, E., Bell, S., Drevinek, P., . . . JS. (2011). A CFTR potentiator in patients with cystic fibrosis and the G551D mutation. *N Engl J Med*, 365:1663–1672.

- Ranganathan, S., Skoric, B., Ramsay, K., Carzino, R., Gibson, A., Hart, E., . . . (AREST-CF), A. R. (2013). Geographical differences in first acquisition of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Ann Am Thorac Soc*, 10:108-114.
- Ratjen, F., & Doring, G. (2003). Cystic Fibrosis. *Lancet*, 361:681– 689.
- Ratjen, F., Comes, G., Paul, K., Posselt, H., Wagner, T., Harms, K., & German Board of the European Registry for Cystic Fibrosis, (. (2001). Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 31:13-6.
- Ratjen, F., Munck, A., Kho, P., Angyalosi, G., & Study Group, E. (2010). Treatment of early *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: the ELITE trial. *Thorax*, 65:286-91.
- Ratkai, C., Peixe, L., Grosso, F., Freitas, A., Antunes, P., Fodor, E., . . . Nagy, E. (2010). Successful application of the DiversiLab repetitive-sequence-based PCR typing system for confirmation of the circulation of a multiresistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospital wards. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67:202-6.
- Razvi, S., Quittell, L., Sewall, A., Quinton, H., Marshall, B., & Saiman, L. (2009). Respiratory microbiology of patients with cystic fibrosis in the United States, 1995 to 2005. *Chest*, 136:1554-1560.
- Reddy, M., & Quinton, P. (2001). Selective activation of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ and HCO₃⁻ conductances. *JOP*, 2:212-8.
- Renders, N., Verbrugh, H., & Van Belkum, A. (2001). Dynamics of bacterial colonisation in the respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Infect Genet Evol*, 1:29-39.
- Riordan, J., Rommens, J., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., & al., e. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene:cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245: 1066-1073.
- Robinson, M., Eberl, S., Tomlinson, C., & al, e. (2000). Regional mucociliary clearance in patients with cystic fibrosis. *J Aerosol Med*, 13:73-86.
- Rogers, G., Hoffman, L., & Döring, G. (2011). Novel concepts in evaluating antimicrobial therapy for bacterial lung infections in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibrosis*, 10:387-400 .
- Rogers, G., Hoffman, L., Johnson, M., Mayer-Hamblett, N., Schwarze, J., Carroll, M., & Bruce, K. (2011). Using bacterial biomarkers to identify early indicators of cystic fibrosis pulmonary exacerbation onset. *Expert Rev Mol Diagn*, 11:197-206.
- Rogers, G., Marsh, P., Stressmann, A., Allen, C., Daniels, T., Carroll, M., & Bruce, K. (2010). The exclusion of dead bacterial cells is essential for accurate molecular analysis of clinical samples. *Clin Microbiol Infect*, 16:1656-8 .
- Roman, F., Canton, R., Perez-Vazquez, M., Baquero, F., & Campos, J. (2004). Dynamics of long-term colonization of respiratory tract by *Haemophilus influenzae* in cystic fibrosis patients shows a marked increase in hypermutable strains. *J Clin Microbiol*, 42:1450-1459.
- Römling, U., Fiedler, B., Bohammer, J., Grothus, D., Greipel, J., Von der Hardt, H., & Tümmler, B. (1994). Epidemiology of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis . *J Infect Dis*, 170:1616-1621.
- Rommens, J., Iannuzzi, M., Kerem, B., Drumm, M., Melmer, D., Dean, M., &

- al., e. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking an jumping. *Science*, 245: 1059-1065.
- Rosenfeld, M., Emerson, J., McNamara, S., Thompson, V., Ramsey, B., Morgan, W., . . . Group, E. S. (2012). Risk factors for age at initial *Pseudomonas* acquisition in the cystic fibrosis epic observational cohort. *J Cyst Fibros*, 11:446-453.
- Rosenfeld, M., Gibson, R., McNamara, S., Emerson, J., Burns, J., Castile, R., & al, e. (2001). Early pulmonary infection, inflammation, and clinical outcomes in infants with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 32:356-66.
- Rosenfeld, M., Ramsey, B., & Gibson, R. (2003). *Pseudomonas* acquisition in young patients with cystic fibrosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Curr Opin Pulm Med*, 9:492-497.
- Rosenstein, B., Cutting, G., & panel, f. t. (1998). The diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr*, 132: 589-595.
- Rubin, B. (2007). CFTR is a modulator of airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 292: L381-L382.
-  Sagel, S., Chmiel, J., & Konstan, M. (2007). Sputum biomarkers of inflammation in cystic fibrosis lung disease. *Proc Am Thorac Soc*, 4:406-417.
- Sagel, S., Gibson, R., Emerson, J., McNamara, S., Burns, J., Wagener, J., . . . Network., C. F. (2009). Impact of *Pseudomonas* and *Staphylococcus* infection on inflammation and clinical status in young children with cystic fibrosis. *J Pediatr*, 154:183-188.
- Saiman, L. (2004). Microbiology of early CF lung disease. *Paediatr Respir Rev*, 5 Suppl A:S367-9.
- Saiman, L., & Siegel, J. (2004). Infection control in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev*, 17:57-71.
- Saiman, L., Chen, Y., Gabriel, P., & Knirsch, C. (2002). Synergistic activities of macrolide antibiotics against *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Alcaligenes xylosoxidans* isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 46:1105-1107.
- Saiman, L., Mayer-Hamblett, N., Campbell, P., Marshall, B., & Group, M. S. (2005). Heterogeneity of treatment response to azithromycin in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 15;172:1008-1012.
- Salcedo, A. (1999). Unidades de Fibrosis Quística: organización y funcionamiento. *An Esp Ped*, 133:59-61.
- Sawicki, G., Rasouliyan, L., & Ren, C. (2009). The impact of MRSA on lung function in patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 179:734-735.
- Schelstraete, P., Van Daele, S., De Boeck, K., Proesmans, M., Lebecque, P., Leclercq-Foucort, J., . . . De Baets, F. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* in the home environment of newly infected cystic fibrosis patients. *Eur Respir J*, 31:822-829.
- Sermet-Gaudelus, I. (2013). Ivacaftor treatment in patients with cystic fibrosis and the G551D CFTR mutation. *Eur Respir Rev*, 22: 66-71.
- Shah, P. M., Nash, K., Cullinan, P., Cole, P., & Wilson, R. (1999). Determinants of chronic infection with *Staphylococcus aureus* in patients with bronchiectasis. *Eur Respir J*, 14:1340-4.
- Sims, E., Mugford, M., Clark, A., Aitken, D., McCormick, J., Mehta, G., & Mehta,

- A. (2007). Economic implications of newborn screening for cystic fibrosis: a cost of illness retrospective cohort. *Lancet*, 369: 1187-1195.
- Sloane, P., & Rowe, S. (2010). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein repair as a therapeutic strategy in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med*, 16:591-597.
- Sly, P., Brennan, S., Gangell, C., de Klerk, N., Murray, C., Mott, L., . . . (AREST-CF), A. R. (2009). Lung disease at diagnosis in infants with cystic fibrosis detected by newborn screening. *Am J Respir Crit Care Med*, 180:146-52.
- Smith, A., Fiel, S., Mayer-Hamblett, N., Ramsey, B., & Burns, J. (2003). Susceptibility testing of *Pseudomonas aeruginosa* isolates and clinical response to parenteral antibiotic administration: lack of association in cystic fibrosis. *Chest*, 123:1495-1502.
- Smith, E., Buckley, D., Wu, Z., Saenphimmachak, C., Hoffman, L., D'Argenio, D., . . . Olson, M. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103:8487-8492.
- Smith, J., Travis, S., Greenberg, E., & Welsh, M. (1996). Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*, 85:229-236.
- Smyth, A., & Walters, S. (2001). Prophylactic antibiotics for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 3:CD001912.
- Soltys, J., Bonfield, T., Chmiel, J., & Berger, M. (2002). Functional IL-10 deficiency in the lung of cystic fibrosis [cfr(-/-)] and IL-10 knockout mice causes increased expression and function of B7 costimulatory molecules on alveolar macrophages. *J Immunol*, 168:1903-1910.
- Southern, K., Munck, A., Pollitt, R., Traver, G., Zanolla, L., Dankert-Roelse, J., & Castellani, C. E. (2007). A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. *J Cyst Fibros*, 6: 57-65.
- Spencer, F., Haupt, S., Claros, M., Walter, S., Lietz, T., Schille, R., & al, e. (2000). Epidemiologic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*, 6:600-607.
- Stewart, P., & Costerton, J. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, 358:135-138.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D., & Costerton, J. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*, 56:187-209.
- Stover, C., Pham, X., Erwin, A., Mizoguchi, S., Warren, P., Hickey, M., . . . Olson, M. (2000). Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406:959-64.
- Struelens, M., Schwam, V., Deplano, A., & Baran, D. (1993). Genome macrorestriction analysis of diversity and variability of *Pseudomonas aeruginosa* strains infecting cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 31:2320-2326.
- Stutts, M., Rossier, B., & Boucher, R. (1997). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator inverts protein kinase A-mediated regulation of epithelial sodium channel single channel kinetics. *J Biol Chem*, 272:14037-40.
- Suci, P., Mittelman, M., Yu, F., & Geesey, G. (1994). Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 38:2125-2133.
- Suri, R., Metcalfe, C., Lees, B., & al, e. (2001). Comparison of hypertonic saline

and alternate-day or daily recombinant human deoxyribonuclease in children with cystic fibrosis: a randomised trial. *Lancet*, 358:1316-1321.

Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147:3-9.



Tang, Y., Sefers, S., Li, H., Kohn, D., & Procop, G. (2005). Comparative evaluation of three commercial systems for nucleic acid extraction from urine specimens. *J Clin Microbiol*, 43:4830-4833.

Tellería Orriols, J., Alonso Ramos, M., Garrote Adrados, J., Fernández Carvajal, I., & Blanco Quirós, A. (2002). Cribado neonatal de fibrosis quística. *An Esp Pediatr*, 57: 60-65.

Tenover, F., Arbeit, R., Goering, R., Mickelsen, P., Murray, B., Persing, D., & Swaminathan, B. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*, 33:2233-2239.

Tobes, R., & Pareja, E. (2006). Bacterial repetitive extragenic palindromic sequences are DNA targets for insertion sequence elements. *BMC Genomics*, 7:62.

Tramper-Stranders, G., Van der Ent, C., & Wolfs, T. (2005). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 4:37-43.

Tramper-Stranders, G., van der Ent, C., Molin, S., Yang, L., Hansen, S., Rau, M. C., . . . Wolfs, T. (2012). Initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in patients with cystic fibrosis: characteristics of eradicated and persistent isolates. *Clin Microbiol Infect*, 18:567-74.

Tramper-Stranders, G., van der Ent, C., Slieker, M., Terheggen-Lagro, S., Teding van Berkhout, F., Kimpen, J., & Wolfs, T. (2006). Diagnostic value of serological tests against *Pseudomonas aeruginosa* in a large cystic fibrosis population. *Thorax*, 61:689-693.

Trancassini, M., De Vito, D., Quattrucci, S., & Cipriani, P. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* antibody detection in cystic fibrosis patients. *New Microbiol*, 22:85-9.

Trandafir, L., Moscalu, M., Diaconu, G., Cîrdeiu, E., Tudose, A., Coman, G., & Păduraru, D. (2013). The impact of respiratory tract infections on the nutritional state of children with cystic fibrosis. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi*, 117:863-9.

Treggiari, M., Rosenfeld, M., Retsch-Bogart, G., Gibson, R., & Ramsey, B. (2007). Approach to eradication of initial *Pseudomonas aeruginosa* infection in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 42:751-6.

Tresse, O., Jouenne, T., & Junter, G. (1995). The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, 36:521-526.

Tsui, L.-C., & Buchwald, M. (1991). Biochemical and molecular genetics of cystic fibrosis. En H. Harris, & K. Hirschhorn, *Advances in Human Genetics* (pág. 153). Nueva York: Plenum.

Tunney, M., Field, T., Moriarty, T., Patrick, S., Doering, G., Muhlebach, M., . . . Elborn, J. (2008). Detection of anaerobic bacteria in high numbers in sputum from patients with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 177:995-1001.



Valdezate, S., Vindel, A., Maiz, L., Baquero, F., Escobar, H., & Canton, R. (2001). Persistence and variability of *Stenotrophomonas maltophilia* in cystic fibrosis patients, Madrid, 1991-1998. *Emer Infect Dis*, 7:113-122.

Valenza, G., Tappe, D., Turnwald, D., Frosch, M., König, C., Hebestreit, H., & Abele-Horn, M. (2008). Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 7:123-127.

van Ewijk, B., van der Zalm, M., Wolfs, T., & van der Ent, C. (2005). Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*, 4:31-36.

Vernez, I., Hauser, P., Bernasconi, M., & Blanc, D. (2005). Population genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* using multilocus sequence typing. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 43:29-35.

Vílchez, G., & Alonso, G. (2009). Alcances y limitaciones de los métodos de epidemiología molecular basados en el análisis de ácidos nucleicos. *Rev Soc Venez Microbiol*, 29:6-12.

W

Wang, S., FitzSimmons, S., O'Leary, L., Rock, M., Gwinn, M., & Khoury, M. (2001). Early diagnosis of cystic fibrosis in the newborn period and risk of *Pseudomonas aeruginosa* acquisition in the first 10 years of life: a registry-based longitudinal study. *Pediatrics*, 107:274-279.

Wark, P., & McDonald, V. (2009). Nebulised hypertonic saline for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev*, 15:CD001506.

Welch, D., Muszynski, M., & Pai, C. (1987). Selective and differential medium for recovery of *Pseudomonas cepacia* from the respiratory tracts of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 25:1730-4.

Welker, M. (2011). Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics*, 11:3143-3153.

Wells, J., Rosenberg, M., Hoffman, G., Anstead, M., & Farrell, P. (2012). A decision-tree approach to cost comparison of newborn screening strategies for cystic fibrosis. *Pediatrics*, 129: e339-347.

Welsh, M., & Smith, A. (1993). Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*, 73: 1251-1254.

West, S., Zeng, L., Lee, B., Kosorok, M., Laxova, A., Rock, M., . . . Farrell, P. (2000). Respiratory infection with *Pseudomonas aeruginosa* in children with cystic fibrosis: early detection by serology and assessment of risk factors. *JAMA*, 287:2958-2967.

Wiesemann, H., Steinkamp, G., Ratjen, F., Przyklenk, B., Döring, G., & Von der Hardt, H. (1998). Placebo-controlled, double-blind, randomized study for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol*, 25: 88-92.

Wilcken, B. (1999). Neonatal screening for cystic fibrosis: present and future. *Acta Paediatr*, 432 (Suppl): 33-35.

Williamson, J., Marmion, B., Worswick, D., Kok, T., Tannock, G., Herd, R., & Harris, J. (1992). Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Antigen capture and PCR-gene amplification for detection of the *Mycoplasma*: problems of clinical correlation. *Epidemiol Infect*, 109:519-537.

Wilson, D., Yen-Lieberman, B., Reischl, U., Warshawsky, I., & Procop, G. (2004). Comparison of five methods for extraction of *Legionella pneumophila*

from respiratory specimens. *J Clin Microbiol*, 42:5913-5916.

Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., . . . Christner, M. (2011). MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages. *Int J Med Microbiol*, 301:64-68.

Wong, K., Roberts, M., Owens, L., Fife, M., & Smith, A. (1984). Selective media for the quantitation of bacteria in cystic fibrosis sputum. *J Med Microbiol*, 17:113-119.

Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K., & al, e. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest*, 109:317-325.



Xu, J., Moore, J., Murphy, P., Millar, B., & Elborn, J. (2004). Early detection of

Pseudomonas aeruginosa - comparison of conventional versus molecular (PCR) detection directly from adult patients with cystic fibrosis (CF). *Annals Clin Microbiol Antimicrob*, 3:21-26.



Zemanick, E., Sagel, S., & Harris, J. (2011). The airway microbiome in cystic fibrosis and implications for treatment. *Curr Opin Pediatr*, 23:319-324.

Zemanick, E., Wagner, B., Sagel, S., Stevens, M., Accurso, F., & Harris, J. (2010). Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens. *PLoS One*, 30;5:e15101.

Zolin, A., McKone, E., & van Rens, J. (2014). *European Cystic Fibrosis Society Patient Registry (ECFSPR) Annual Report 2010*. Karup (Denmark): European Cystic Fibrosis Society.



ANEXOS

ANEXO I. FICHAS DE PACIENTES CON PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Paciente 1

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	16/11/1965	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del	Bronquiectasias:	Si
Edad diagnóstico:	ND	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	Si	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	Enfermedad hepática sin cirrosis
		Antibioterapia previa:	ND
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2002	NINGUNO (no infección)	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>S. aureus</i>				1	2	2		1	1	1			2		1	2
<i>S. maltophilia</i>				1						1		1				
<i>B. bronchiseptica</i>					1	1	1	2	2	2						
<i>A. xylosoxidans</i>										1						
<i>P. aeruginosa</i>									1							

Paciente 2

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	12/01/1984
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	ND
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	Enfermedad hepática sin cirrosis
Antibioterapia previa:	GENTAMICINA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2007	CIPROFLOXACINO vo	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>								2			1	1	2	2				
<i>P. aeruginosa</i>														1				

Paciente 3

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	26/10/1994
Mutaciones CFTR:	G542X/Q890X
Edad diagnóstico:	0,17
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	AMC vo x3
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2000	NINGUNO (no infección)	
2002	NINGUNO (no infección)	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>									1			1	1					1
<i>H. influenzae</i>						1	2	4									1	1
<i>S. pneumoniae</i>																	1	
<i>S. maltophilia</i>															1	1		
<i>A. lwoffii</i>									1	1		1				1		
<i>P. aeruginosa</i>							2		1									

Paciente 4

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	14/06/1987
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	08/01/1900
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	No

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	CIPROFLOXACINO vo, CEFUROXIMA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2002	TOBRAMICINA inh	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>			1			1	1	1		1	1	1						1
<i>H. influenzae</i>					1													
<i>P. aeruginosa</i>									1	1	1							

Paciente 5

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	20/05/1994
Mutaciones CFTR:	F508del/519-delT
Edad diagnóstico:	6,50
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreática:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	Si
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	Enfermedad hepática sin cirrosis
Antibioterapia previa:	CLOXACILINA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2001	CIPROFLOXACINO vo	
2009	CIPROFLOXACINO vo	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>							1	4	3	3	3	4	3	6	5	6	5	3
<i>H. influenzae</i>							1	2	1	1				2	1			
<i>P. aeruginosa</i>								1	3							1	2	

Paciente 6

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	04/06/1974
Mutaciones CFTR:	R1066/D1152H
Edad diagnóstico:	28,33
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	Si
Hemoptisis:	Leve
IMC <10:	No
ABPA:	Si
Hospitalización:	Si
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	LEVOFLOXACINO vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2002	CEFTAZIDIMA iv	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>									1	3	4	2	2	3	4		3	
<i>H. influenzae</i>										5	2	1	2	3	4	1	2	2
<i>S. pneumoniae</i>																	2	
<i>S. maltophilia</i>																1	2	
<i>A. baumannii</i>														1				
<i>P. aeruginosa</i>									1									2

Paciente 7

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	05/06/2004	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	R553X/R1162X	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,50	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	Si	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	Si	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	AZITROMICINA vo
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2007	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>											1	1	4				3	4
<i>H. influenzae</i>												1		1		1	1	1
<i>S. pneumoniae</i>												1				3		
<i>S. maltophilia</i>											1							1
<i>P. aeruginosa</i>														1				

Paciente 8

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	19/07/2000	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,17	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	Si
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	No	Hospitalización:	Si
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	AMC vo, CEFUROXIMA vo, CIPROFLOXACINO
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2001	NINGUNO (no infección)	
2003	CIPROFLOXACINO vo	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>							2			2	1		1	4	5	5	5	4
<i>H. influenzae</i>								1				1	1			2	1	
<i>S. pneumoniae</i>								2	1		1							
<i>P. aeruginosa</i>								2		1	1							

Paciente 9

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	25/01/1991
Mutaciones CFTR:	F508del/G1349D
Edad diagnóstico:	9,00
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si
Residencia en área metropolitana:	No

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	No
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	VANCOMICINA inh, CLOXACILINA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2000	TOBRAMICINA inh	TOBRAMICINA inh
2006	CIPROFLOXACINO vo	COLISTINA inh/ AZITROMICINA vo

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>							1	1	2	4	7	3	5	5	6	5	5	5
<i>H. influenzae</i>								1										2
<i>S. maltophilia</i>				1			2	1	4	5	1	1						
<i>A. xylosoxidans</i>								1	2	1								
<i>P. aeruginosa</i>							2	2	2				1	3	2	1		1

Paciente 10

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	20/06/1988	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/E588V	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	ND	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	Si	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	ND
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
1995	ND	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
<i>S. aureus</i>	2	1	2		1	3	3	3	3	1	1	1			1	1
<i>H. influenzae</i>				1												
<i>S. pneumoniae</i>		2		1				1								
<i>S. maltophilia</i>	1															
<i>A. baumannii</i>	1															
<i>P. aeruginosa</i>		1														

Paciente 11

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	29/06/2009
Mutaciones CFTR:	F508del/G542X
Edad diagnóstico:	0,08
Cribado neonatal:	Realizado, positivo
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	Si
ABPA:	No
Hospitalización:	Si
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	No administrado
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	-

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2009	CEFTAZIDIMA iv	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>																3	1	10
<i>H. influenzae</i>																		1
<i>S. pneumoniae</i>																	3	6
<i>S. maltophilia</i>																1		
<i>Acinetobacter spp.</i>																1		1
<i>A. xylosoxidans</i>																		1
<i>P. aeruginosa</i>																1		

Paciente 12

CARACTERISTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	16/07/1990
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	9,50
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	Si
Residencia en área metropolitana:	No

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	Si
Hemoptisis:	Moderada
IMC <10:	Si
ABPA:	No
Hospitalización:	Si
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	CEFTRIAXONA iv, CEFUROXIMA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2007	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv	COLISTINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>												5	3	4				1
<i>H. influenzae</i>												1	1	2				
<i>S. maltophilia</i>														1				
<i>P. aeruginosa</i>														1			1	1

Paciente 13

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	24/07/1999	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/Desconocida	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,42	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	Si
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	No	Hospitalización:	Si
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	SXT vo, AZITROMICINA vo
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2000	NINGUNO (no infección)	
2002	TOBRAMICINA inh	TOBRAMICINA inh
2006	CIPROFLOXACINO vo	FOSFOMICINA vo

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>							2				1		4			2	5	8
<i>H. influenzae</i>							1	1	2	1			2				1	
<i>S. pneumoniae</i>									2			1						
<i>S. maltophilia</i>															2	3		
<i>P. aeruginosa</i>							1		1				2					

Paciente 14

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	21/10/1982
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	ND
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No
Residencia en área metropolitana:	No

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreática:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	Enfermedad hepática sin cirrosis
Antibioterapia previa:	CEFUROXIMA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
1995	CIPROFLOXACINO vo	
2002	COLISTINA inh	AZITROMICINA vo
2007	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>	2	2	4	3	4	2	2	2	2	1	2	2	1	4	3	3	1	
<i>H. influenzae</i>			1													1	1	
<i>S. pneumoniae</i>														1				
<i>S. maltophilia</i>			1					1	1									
<i>Burkholderia</i>			1															
<i>P. aeruginosa</i>		3		1	2				1					1				

Paciente 15

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	25/06/1995
Mutaciones CFTR:	F508del/L206W
Edad diagnóstico:	1,00
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	No
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	ND
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
1997	CIPROFLOXACINO vo	AZITROMICINA vo

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>					1			1	1					4				
<i>H. influenzae</i>			1	1	4			1										1
<i>S. pneumoniae</i>				1	2								1					
<i>P. aeruginosa</i>				1	1													

Paciente 16

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	10/08/2002	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/G542X	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,00	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	Realizado, positivo	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	Si	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	No administrado
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	-

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2004	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>																		1
<i>H. influenzae</i>											2	1		2		1	1	
<i>S. pneumoniae</i>											1	1	1					
<i>S. maltophilia</i>																	1	
<i>P. aeruginosa</i>											1							

Paciente 17

CARACTERISTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	08/08/1993
Mutaciones CFTR:	F508del/W1282X
Edad diagnóstico:	9,67
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	hepática sin
Antibioterapia previa:	AMC vo, CLARITROMICINA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2008	CIPROFLOXACINO vo	COLISTINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>										2	3	4	3	2	7	5	5	3
<i>S. maltophilia</i>																1		
<i>A. xylosoxidans</i>														1	1			
<i>P. aeruginosa</i>															1	2	1	

Paciente 18

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	04/09/2007	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/CFTR50kdel	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,00	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	No	Hospitalización:	Si
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	AMC vo
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2008	CEFTAZIDIMA iv/ CIPROFLOXACINO vo	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>															2			1
<i>H. influenzae</i>																1		4
<i>S. pneumoniae</i>																	1	1
<i>S. maltophilia</i>															1	1		
<i>P. aeruginosa</i>															2			

Paciente 19

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	12/02/1991	DMRFQ:	Si
Mutaciones CFTR:	N1303/N1303	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,42	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	No	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	Enfermedad hepática sin cirrosis
		Antibioterapia previa:	AMC vo
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2003	CEFTAZIDIMA iv	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>			2	1							1				1	3		
<i>H. influenzae</i>			2	1	1	1	2	3										
<i>S. pneumoniae</i>			1	1	1									1				
<i>S. maltophilia</i>																		
<i>Burkholderia</i>					1													
<i>P. aeruginosa</i>										1	4	3	2	4	7	10	6	7

Paciente 20

Características del Paciente

Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	31/08/1997
Mutaciones CFTR:	F508del/G85E
Edad diagnóstico:	1,08
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

Factores de Riesgo

Insuficiencia pancreática:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	ND
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

Antibioterapia recibida en la primocolonización por *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2000	ND	ND
2002	ND	ND
2007	ND	ND

Seguimiento Microbiológico

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>					1	1	3	3	2	2	3	2		1		1	4	5
<i>H. influenzae</i>						1	1	1	1	1		1						
<i>S. pneumoniae</i>						1		1										
<i>S. maltophilia</i>									1	1								
<i>A. baumannii</i>									1									
<i>P. aeruginosa</i>							2		2					1	1	4		1

Paciente 21

Características del paciente

Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	15/03/1992
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	0,58
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

Factores de riesgo

Insuficiencia pancreática:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	Si
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	CEFUROXIMA vo
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	No

Antibioterapia recibida en la primocolonización por *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
1994	NINGUNO (no infección)	
2001	TOBRAMICINA inh	TOBRAMICINA inh
2006	CIPROFLOXACINO vo	COLISTINA inh

Seguimiento microbiológico

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>	2	5		3	3	2	3	1	4	2	3	4	4	6	5	7	8	9
<i>H. influenzae</i>		3	1	2	2	2	3	4	1				1				1	2
<i>S. pneumoniae</i>		2								1								
<i>S. maltophilia</i>				2				1	4	4	1	2	1			1		
<i>C. indologenes</i>						1											1	1
<i>A. xylosoxidans</i>																	1	1
<i>P. aeruginosa</i>	1	1						2	1				1		1			

Paciente 22

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE		FACTORES DE RIESGO	
Sexo:	Varón	Insuficiencia pancreática:	Si
F. Nacimiento:	22/01/1999	DMRFQ:	No
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del	Bronquiectasias:	No
Edad diagnóstico:	0,50	Hemoptisis:	No
Cribado neonatal:	No	IMC <10:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si	ABPA:	No
Residencia en área metropolitana:	No	Hospitalización:	No
		Hepatopatía:	No
		Antibioterapia previa:	CIPROFLOXACINO vo, SXT vo
		Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
1999	CIPROFLOXACINO vo	
2003	CIPROFLOXACINO vo/SXT vo	

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>										3			2				1	1
<i>H. influenzae</i>								3								1		
<i>S. pneumoniae</i>										1				1				
<i>S. maltophilia</i>								1					1					
<i>A. baumannii</i>														1				
<i>C. indologenes</i>																1		
<i>A. xylosoxidans</i>								1			1							
<i>P. aeruginosa</i>						2	1	1		3	3	4	3	3	4	8	5	5

Paciente 23

Características del Paciente

Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	25/09/2002
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	0,67
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i> :	No
Residencia en área metropolitana:	Si

Factores de Riesgo

Insuficiencia pancreática:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	Si
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	ND
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

Antibioterapia recibida en la primocolonización por *P. aeruginosa*

Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2003	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv/ CIPROFLOXACINO vo	

Seguimiento Microbiológico

Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>										1			1					
<i>H. influenzae</i>											1	1	2					
<i>S. pneumoniae</i>													1					1
<i>S. maltophilia</i>													1					
<i>A. baumannii</i>										1								
<i>A. xylosoxidans</i>																1		
<i>P. aeruginosa</i>										2	2	5	5	2	3	1	2	3

Paciente 24

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	25/09/2002
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	0,67
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	No
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	Si
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	ND
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	ND

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2009	CIPROFLOXACINO vo	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>H. influenzae</i>																2		2
<i>S. pneumoniae</i>																		1
<i>A. xylosooxidans</i>																	2	
<i>P. aeruginosa</i>																2		

Paciente 25

CARACTERÍSTICAS DEL PACIENTE	
Sexo:	Varón
F. Nacimiento:	23/02/2004
Mutaciones CFTR:	F508del/F508del
Edad diagnóstico:	1,08
Cribado neonatal:	No
Vacuna <i>P. aeruginosa</i>	Si
Residencia en área metropolitana:	Si

FACTORES DE RIESGO	
Insuficiencia pancreatica:	Si
DMRFQ:	No
Bronquiectasias:	No
Hemoptisis:	No
IMC <10:	No
ABPA:	No
Hospitalización:	No
Hepatopatía:	No
Antibioterapia previa:	SXT vo, FOSFOMICINA vo x2
Antibioterapia por <i>S. aureus</i> :	Si

ANTIBIOTERAPIA RECIBIDA EN LA PRIMOCOLONIZACIÓN POR <i>P. aeruginosa</i>		
Año	Tratamiento inicial	T. de mantenimiento
2007	CEFTAZIDIMA iv/ TOBRAMICINA iv	TOBRAMICINA inh

SEGUIMIENTO MICROBIOLÓGICO																		
Microorganismos, (Nº por año)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
<i>S. aureus</i>												3	3	2	2	5	2	6
<i>H. influenzae</i>																	1	
<i>S. maltophilia</i>																1		
<i>P. aeruginosa</i>														1				

ANEXO II. SUMMARY

Title:

First colonization by *Pseudomonas aeruginosa* in bronchopulmonary pathogenic colonization in cystic fibrosis: diagnosis techniques of molecular microbiology, clonality study and growth in biofilm

Summary:

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa is the most relevant and characteristic pathogen in patients with cystic fibrosis (CF). The lung colonization/infection by this microorganism might be differenced in three stages: initial colonization, intermittent colonization, and chronic colonization. It is important to remark that the first colonization concept included the first positive culture for *P. aeruginosa*, but also the reemergence of a positive culture after a year of eradication treatment.

The colonization-infection with *P. aeruginosa* has an enormous relevancy in the evolution and prognosis of patients with CF, both prevention and treatment of infections are critical. The most important objective is to prevent chronic colonization by *P. aeruginosa*. The certainty that an aggressive antibiotic treatment at the moment of the first isolation of *P. aeruginosa* is crucial to prevent or delay chronic colonization has increased the importance and need for rapid and sensitive techniques for detection, such as detection of *P. aeruginosa* of respiratory samples for PCR.

OBJECTIVES

After the background described, seven key objectives raised in this thesis:

1. To determine the prevalence of *P. aeruginosa*, its pattern of colonization in patients treated at the Cystic Fibrosis Unit of the Hospital Universitario Ramón y Cajal between 1993 and 2011, as well as analysis of the evolution of lung colonization by *P. aeruginosa* in different periods (1993-1995, 2002-2003, 2006-2007, 2010-2011) taking into account the impact of the measures implemented over the years (vaccination against *P. aeruginosa*, using azithromycin, inhalation of hypertonic saline, neonatal screening) and the incorporation of new techniques for bacterial identification (mass spectrometry MALDI-TOF).
2. To describe the epidemiological and clinical characteristics of patients with CF with *P. aeruginosa* first lung colonization in our hospital (1994-2009) and check if the acquisition of *P. aeruginosa* has a specific risk factor.
3. To establish the capacity for growth in biofilms of *P. aeruginosa* strains isolated from CF patients undergoing first colonization, comparing their antibiotic sensitivity in biofilm and planktonic growth and the possible presence of hyper-mutable strains.
4. To develop a method to test the ability of different antimicrobial to prevent the biofilm formation and definition of a new parameter, BPC (concentration that prevents biofilm formation).
5. To know the population structure of first colonization isolates and analyze their genetic relationship by pulsed field electrophoresis (PFGE), Multilocus Sequence Typing (MLST) and rep-PCR DiversiLab.
6. Adapt the new techniques of mass spectrometry (MS) to analyze the clonality and evolution of *P. aeruginosa* isolates within the same patient and between multiple patients as well as strengthen and evaluate the methodology for the detection and identification of CF microorganisms.
7. Assess whether microbiology molecular techniques improve detection of *P. aeruginosa* in respiratory samples of CF patients without lung colonization by this organism in our hospital.

MATERIAL AND METHODS

The thesis is divided into three sections:

1. First, we start with a comprehensive study on the CF unit. In order to meet the evolution in the epidemiology of lung colonization by *P. aeruginosa* in patients treated at the CF Unit of the Hospital Universitario Ramón y Cajal, a retrospective analysis between the years 1993-2011 of the microbiological results was performed. This analysis has been divided into four separate time periods: 1993-1995, 2002-2003, 2006-2007, 2010-2011.
2. To study CF patients with *P. aeruginosa* first colonization, we select a group of patients that could be dated first colonization events, corresponding to a total of 25 patients. We proceeded to the collection of epidemiological and clinical data.
3. 196 isolates available, from first colonization and later in monitoring patients from 1994 to 2009, were studied: count, morphotype, identification, mutation frequency and profile of planktonic sensitivity. It was complemented by the study of antimicrobial susceptibility of biofilms: concentration inhibiting biofilm growth (CIB) and concentration to prevent biofilm formation (CPB). The analysis of the molecular epidemiology of clinical isolates of *P. aeruginosa* was performed using four different techniques: PFGE, rep-PCR DiversiLab, MLST and MALDI-TOF MS.
4. Finally, to assess the early detection of *P. aeruginosa* by Molecular Microbiology techniques, 311 respiratory samples from 34 patients obtained from three years of follow up (2005-2008) were amplified with a primer to a broad spectrum target of eubacteria (16S rDNA) and the specific primers for *mucA* and *oprL* *P. aeruginosa* genes.

RESULTS

1. In the study of the evolution of bronchopulmonary colonization of patients treated at the Cystic Fibrosis Unit of the Hospital Universitario Ramon y Cajal in four different periods (1993-1995, 2002-2003, 2006-2007, 2010-2011) the microorganisms detected were similar in all study periods, being majority *P. aeruginosa*. The prevalence of *P. aeruginosa* in these patients showed a value close to 70% in 1993, decreasing gradually to 35% in 2011. It has been detected a decrease in *P. aeruginosa* colonization in respiratory samples in short age patients. We have seen an increase in the average life of patients, although the mean age suffered a decline in 2010 by the incorporation of newborns CF diagnosed by neonatal screening.
2. *P. aeruginosa* lung first colonization occurred in the first year of life in 28% of 25 patients with CF selected between the attended ones in the Cystic Fibrosis Unit of the Hospital Universitario Ramón y Cajal (1994-2009). The average age of acquisition of *P. aeruginosa* was 8.5 years, but in 22 pediatric patients was 5.6 years. The mean age was lower (4.0 years) in 7 patients (32%) who had low percentile of body mass index (BMI below the 10th percentile) and upper (6.2 years) in 16 (72%) with *Staphylococcus aureus* during the year before to the isolation of *P. aeruginosa*.
3. In the initial strains of *P. aeruginosa* from CF patients we have seen a high genetic diversity, without detecting any strain belonging to international epidemic clones. In the study the clonality of 25 first colonization strains, we obtained 24 pulsotypes by PFGE-*SpeI* compared to 25 different patterns by rep-PCR DiversiLab and MALDI-TOF and 22 clones by MLST.
4. Using a method to test the ability of prevention of various antimicrobial to biofilm formation, we found that the concentration of antimicrobial required to prevent biofilm formation is less than that to inhibit it once formed although it is higher than necessary in planktonic growth (usually determined).

5. Amplification by oprL and mucA primers to detect *P. aeruginosa* in respiratory samples achieved optimal values of positive predictive value (PPV of 100% for oprL and 83% for mucA, considering as reference the positive culture simultaneous and later). 5.5% of respiratory samples tested were negative by culture but positive by PCRs, by mucA (n = 13), oprL (n = 1) or both (n = 3), belonged to 15 patients. Of these, seven had first colonization by *P. aeruginosa* in an average period of one year (range 4-22 months) and three had intermittent colonization.

CONCLUSIONS

1. The data analysis of bronchopulmonary colonization of patients seen at the Cystic Fibrosis Unit of the Hospital Universitario Ramon y Cajal in the periods 1993-1995, 2002-2003, 2006-2007 and 2010-2011 has shown the distribution of bacterial species was similar in all study periods, despite the different clinical implemented preventive measures (vaccination, hypertonic saline and azithromycin).
2. It has been detected a progressive decrease in the prevalence of *P. aeruginosa*, lagging in the last period first colonization age.
3. The average age of acquisition of *P. aeruginosa* is 8.5 years, noting that 28% patients occurred during the first year of life. It was significantly associated with a delay in first colonization in patients with higher BMI and previous colonization by *S. aureus*.
4. First colonization isolates have a low rate of antimicrobial resistance. Hypermutation mechanism is not relevant although there is a high proportion of weak mutator strains (22%).
5. It has defined a new parameter called Preventive Concentration forming a Biofilm which is useful for correlating in vitro microbiological studies with clinical outcomes. The concentration of antimicrobial needed to prevent formation of a biofilm is less than that needed to inhibit it once already formed. This parameter is essential to optimize the first colonization eradication therapy.

6. The high genetic diversity detected in our first colonization strains demonstrates independent acquisition events with scarce transmission between patients. No international epidemic clone of *P. aeruginosa* was detected
7. There is a good agreement in the results obtained by rep-PCR DiversiLab and other molecular epidemiology techniques employed, the discrepancies being due to a high sensitivity in the detection of small variations.
8. MALDI-TOF mass spectrometry identifies correctly *P. aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients regardless of their morphotype. This technique is also valid for the study of the persistence of the same clone over the years in one patient, while having no ability to discriminate isolated from several patients.
9. PCR amplification for *oprL* and *mucA* genes early detects the presence of *P. aeruginosa* in sputum with negative culture and could be implemented as rapid molecular screening method in first colonization phases in which a low number of microorganisms viable is expected.

ANEXO III. PUBLICACIONES

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Alba, J., Morosini, M., Lamas, A., Romero, B., y cols. (2013). Population structure and antimicrobial susceptibility of both nonpersistent and persistent *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol* , 51:2761-2765.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Maiz, L., Lamas, A., Baquero, F., & Cantón, R. (2012). In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patients. *Int J Antimicrob Agents* , 40:173-176.

Fernández-Olmos, A., García-Castillo, M., Morosini, M., Lamas, A., Máiz, L., & Cantón, R. (2012). MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* , 11:59-62.

Population Structure and Antimicrobial Susceptibility of Both Nonpersistent and Persistent *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Recovered from Cystic Fibrosis Patients

Ana Fernández-Olmos,^a María García-Castillo,^a José María Alba,^{a,b} María Isabel Morosini,^{a,c} Adelaida Lamas,^d Beatriz Romero,^a Juan Carlos Galán,^{a,c} Rosa del Campo,^{a,c} Rafael Cantón^{a,c}

Servicio de Microbiología and Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain^a; CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Madrid, Spain^b; Spanish Network for the Research in Infectious Diseases (REPI), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain^c; Unidad de Fibrosis Quística, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain^d

Seventy-six *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from chronically ($n = 18$) and nonchronically ($n = 18$) colonized cystic fibrosis (CF) patients (2002 to 2009) were grouped in separate polyclonal populations. International CF epidemic clones were not identified, but the high-risk clone ST274, also found circulating in Spanish hospitals, was present. Persistent isolates were more resistant to antibiotics than nonpersistent isolates.

Molecular typing tools applied to *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from cystic fibrosis (CF) patients have demonstrated not only local epidemiological differences (1–4) but also the spread of particular multiresistant clones through different CF units (5–8) and the *in vivo* evolution of single clones involving multilocus sequence type (MLST) shifts (9). Nevertheless, studies addressing differences in terms of population structure between nonpersistent and persistent isolates from CF patients have not yet been reported. This work was performed to describe the genetic diversity of *P. aeruginosa* colonizing CF patients from a CF unit in a university hospital in Spain, differentiating between nonpersistent isolates (isolates recovered once or during a <6-month period in consecutive sputum cultures) and persistent isolates (genetically related isolates recovered during a minimum of 6 months) (4, 10). All morphologically different colonies cultured from each sputum sample during the follow-up period were analyzed. When only nonpersistent isolates were recovered, patients were considered nonchronically colonized. On the other hand, patients were considered chronically colonized when persistent isolates were recovered.

Seventy-six *P. aeruginosa* isolates from 36 CF patients in our CF unit between 2002 and 2009 were included. Patients and isolates were distributed in two groups (Tables 1 and 2). The first one included 18 patients from whom 26 *P. aeruginosa* nonpersistent isolates were recovered. The second group included 18 chronically colonized *P. aeruginosa* patients from whom 48 persistent isolates were obtained. In two of these chronically colonized patients, two isolates were recovered on one occasion each, and these isolates were grouped within the nonpersistent isolates (Table 1). The follow-up protocol for CF patients in our institution includes 4 to 5 microbiological sputum analyses per year, with additional sputum analysis during exacerbations or admittance to the hospital. The first and the subsequent isolates that were indistinguishable or highly related according to standard pulsed-field electrophoresis (PFGE) typing criteria were considered a single lineage (11), and only one isolate was included for further studies.

Isolates were initially typed by PFGE using *SpeI* enzyme and interpreted by standard criteria (9, 11). One isolate per pulso-

type was subsequently typed by the MLST scheme developed by Keith Jolley (University of Oxford; <http://pubmlst.org/paeruginosa>) and analyzed by using minimum spanning tree (MST) analysis (<http://goeburst.phyloviz.net/>). Bayesian phylogenetic trees (BAPS) based on concatenated nucleotide sequences from the same fragments used in the MLST approach were also performed (12). MLST nucleotide sequences from representative multidrug-resistant clones circulating in 16 Spanish hospitals (1), as well as the Dutch sequence type (ST) ST406 and ST497, Liverpool ST146, and Manchester ST148 international CF epidemic clones (5–8), were included in the analysis. Antibiotic susceptibility was determined by standard broth microdilution and interpreted with CLSI criteria (13). Statistical differences in antimicrobial resistance were explored by chi-square test and Fisher's exact test.

Within the 28 nonpersistent isolates (26 from nonchronically colonized patients and 2 from chronically colonized patients) (Table 1), 22 STs were identified; 20 of them were unrelated, and the other two corresponded to single-locus variants (SLV) (ST253 and ST540) (Fig. 1). STs representing more than one isolate were ST274 ($n = 4$), ST312 ($n = 2$), ST395 ($n = 2$), and ST809 ($n = 2$). The scarce genetic relationship between these STs suggested that clones involved in primocolonization without persistence corresponded to nonrelated acquisition events (Fig. 1 and 2). The PFGE patterns confirmed this hypothesis. Six of the 22 primocolonizer STs were previously described in Spanish hospitals (ST27, ST253, ST274, ST395, ST508, and ST606) (1), suggesting potential acqui-

Received 24 March 2013 Returned for modification 25 April 2013

Accepted 7 June 2013

Published ahead of print 12 June 2013

Address correspondence to Rafael Cantón, rafael.canton@salud.madrid.org.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00802-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JCM.00802-13



Short communication

In vitro prevention of *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation with antibiotics used in cystic fibrosis patientsAna Fernández-Olmos^a, María García-Castillo^a, Luis Maiz^b, Adelaida Lamas^b, Fernando Baquero^{a,c}, Rafael Cantón^{a,c,*}^a Servicio de Microbiología, and CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS) and Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain^b Unidad de Fibrosis Quística, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid 28034, Spain^c Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 April 2012

Accepted 10 April 2012

Keywords:

Pseudomonas aeruginosa

Biofilms

Susceptibility testing

Biofilm prevention concentration

ABSTRACT

The ability of antibiotics used in bronchopulmonary infections in cystic fibrosis (CF) patients to prevent *Pseudomonas aeruginosa* early biofilm formation was studied using a biofilm microtitre assay with 57 non-mucoid *P. aeruginosa* isolates (44 first colonisers and 13 recovered during the initial intermittent colonisation stage) obtained from 35 CF patients. Minimum biofilm inhibitory concentrations (BICs) of levofloxacin, ciprofloxacin, imipenem, ceftazidime, tobramycin, colistin and azithromycin were determined by placing a peg lid with a formed biofilm onto microplates containing antibiotics. A modification of this protocol consisting of antibiotic challenge during biofilm formation was implemented in order to determine the biofilm prevention concentration (BPC), i.e. the minimum concentration able to prevent biofilm formation. The lowest BPCs were for fluoroquinolones, tobramycin and colistin and the highest for ceftazidime and imipenem. The former antibiotics had BPCs identical to or only slightly higher than their minimum inhibitory concentrations (MICs) determined by standard Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) microdilution and were also active on formed biofilms as reflected by their low BIC values. In contrast, ceftazidime and imipenem were less effective for prevention of biofilm formation and on formed biofilms. In conclusion, the new BPC parameter determined in non-mucoid *P. aeruginosa* isolates recovered during early colonisation stages in CF patients supports early aggressive antimicrobial treatment guidelines in first *P. aeruginosa*-colonised CF patients.

© 2012 Elsevier B.V. and the International Society of Chemotherapy. All rights reserved.

1. Introduction

Pseudomonas aeruginosa is the most relevant pathogen colonising the respiratory tract of cystic fibrosis (CF) patients and causes an important decline of pulmonary function [1]. Early control of *P. aeruginosa* colonisation seems critical to delay the onset of chronic lung infection. Different antimicrobial treatment protocols have been established once first colonisation with *P. aeruginosa* is demonstrated [2]. Early colonisation involves non-mucous colonial morphotypes with a low bacterial density. Once colonisation progresses, eradication is virtually impossible; the bacterial density increases and switches to a mucous morphotype with a biofilm mode of growth that is, in general, less susceptible to antimicrobials [3]. However, in the early stages of colonisation, *P. aeruginosa* can be effectively eradicated with appropriate antibiotic therapy [1,4]. An important issue that has not been sufficiently explored is the potential prevention of biofilm formation during the early stages

of the colonisation process. Such prevention might consolidate the desired process of early lung *P. aeruginosa* eradication.

Development of *P. aeruginosa* biofilms is positively correlated with the number of planktonic cells interacting with mucosal surfaces. Moreover, short-range cell migration from an already established biofilm might contribute to local biofilm expansion [5]. Therefore, reduction of the planktonic cell density is critical to prevent biofilm formation. The aim of this study was to explore a 'biofilm prevention concentration' (BPC) and to compare it with standard planktonic testing [minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC)] as well as the biofilm inhibitory concentration (BIC) and biofilm bactericidal concentration (BBC) using non-mucoid *P. aeruginosa* isolates recovered in either the first or early colonisation stage in CF patients.

2. Materials and methods

2.1. Patients and selection of bacterial isolates

In total, 57 non-mucoid *P. aeruginosa* isolates (44 first colonisers and 13 obtained during the initial intermittent colonisation

* Corresponding author. Tel.: +34 913 368 330; fax: +34 913 368 809.
E-mail address: rcanton.hrc@salud.madrid.org (R. Cantón).

Short Communication

MALDI-TOF MS improves routine identification of non-fermenting Gram negative isolates from cystic fibrosis patients

Ana Fernández-Olmos ^a, María García-Castillo ^a, María-Isabel Morosini ^a, Adelaida Lamas ^c,
Luis Máiz ^c, Rafael Cantón ^{a, b, *}

^a Servicio de Microbiología and CIBER en Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Hospital Universitario Ramón y Cajal and Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), 28034 Madrid, Spain

^b Unidad de Resistencia a Antibióticos y Virulencia Bacteriana Asociada al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid, Spain

^c Unidad de Fibrosis Quística, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034-Madrid, Spain

Received 23 June 2011; received in revised form 5 September 2011; accepted 7 September 2011

Available online 2 October 2011

Abstract

Identification of non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB) from cystic fibrosis (CF) patients is often limited. A collection of stored NFGNB isolates (n=182) recovered from CF patients over a 15 year period was examined. The routinely reported identification during this period was compared with that obtained by MALDI-TOF MS. Isolates giving discrepant identification at the genus level were further analyzed by 16S rDNA sequencing. The MALDI-TOF MS system identified 94% of the isolates, including *Burkholderia cepacia* and *Pandoraea* spp. isolates, the latter previously misidentified as other NFGNB by conventional microbiological methods. Lack of identification by MALDI-TOF MS was associated with the absence of entries in the database.

© 2011 European Cystic Fibrosis Society. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Cystic fibrosis; Proteomic identification; MALDI-TOF MS; Non-fermenting isolates

Non-fermenting Gram-negative bacteria (NFGNB) are environmental organisms that can cause opportunistic severe infections, especially in immunocompromised patients. In cystic fibrosis (CF) patients, the main causes of morbidity and mortality are the decline in pulmonary function secondary to pathogenic colonization with NFGNB [1]. Nevertheless, different bacterial species in CF-patients display distinct degrees of pathogenicity, thus requiring different clinical management [2]. Correct identification of these bacteria by conventional microbiology methods is often limited due to low biochemical reactivity [3]. Moreover, isolates from patients with chronic pathogenic colonization often lose their characteristic phenotypes or growth conditions [4]. In addition, bacterial misidentification could be due to the fact that the species are not in the database of the commercial systems used in clinical laboratories. In these cases, molecular tools such as 16S rDNA gene

sequencing provide reliable results, although it might have problems to assign at specie level [5].

Recently, several studies have reported the use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for bacterial identification, including NFGNB [6, 7]. This technique has been recently introduced in clinical microbiology laboratories [8]. It is based on relative molecular masses of proteins producing specific mass-spectral fingerprints for different organisms. The reproducibility of the MALDI-TOF MS is based on the measurement of high-abundance proteins, including ribosomal proteins and the final identification is not significantly influenced by variability in environmental or growth conditions.

In this study we reassessed by MALDI-TOF MS historical routine identification results obtained by conventional methods of NFGNB recovered from sputum samples from 70 CF-patients attended in our CF-Unit from 1994 to 2009 and obtained during routine follow-up visits or during exacerbations. *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia* isolates were

* Corresponding author. Tel.: +34 913368330; fax: +34 913368809.

E-mail address: rcanton.hrc@salud.madrid.org (R. Cantón).